

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Contribution à l'étude de l'interaction entre WAK1 (Wall-associated kinase) et la pectine
obtention de récepteurs hybrides WAK1/BRI1**

Boland, Aurelien

Award date:
2005

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Contribution à l'étude de l'interaction entre WAK1
(Wall-associated kinase) et la pectine**

Obtention de récepteurs hybrides WAK1/BRI1

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Aurélien BOLAND
Juin 2005

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Contribution à l'étude de l'interaction entre WAK1 (Wall-associated kinase) et la pectine

Obtention de récepteurs hybrides WAK1/BRI1

BOLAND Aurélien

Résumé

Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a révélé la présence de plus de 600 gènes encodant des récepteurs dont la majorité sont encore doublement orphelins, c'est-à-dire dont on ne connaît ni le ligand ni la voie de transduction du signal.

Parmi ces gènes, la famille des Wall-associated kinase (WAKs) comprend 5 isoformes codant pour des récepteurs sérine/thréonine kinases transmembranaires. L'isoforme WAK1 interagit avec la pectine, composant majeur de la paroi cellulaire végétale et éliciteur de nombreuses réponses physiologiques, et est considéré comme un candidat sérieux pouvant assurer une communication entre la matrice extracellulaire et le protoplaste.

Dans un premier temps, afin de contribuer à l'étude de l'interaction de WAK1 avec la pectine et prouver son rôle signalétique, nous avons obtenu une construction encodant un récepteur hybride comprenant les domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire de WAK1 et le domaine intracellulaire de BRI1 (récepteur des brassinostéroïdes). Cette construction permettra, dans une étude ultérieure, d'activer le récepteur hybride par des pectines via le domaine extracellulaire de WAK1 et de mesurer la transduction du signal via la transcription de gènes spécifiques de BRI1.

A partir de cette première construction, des versions mutées au niveau du domaine extracellulaire ou intracellulaire ont été produites. Ces différentes constructions ont été introduites dans le génome d'*A.thaliana* par la méthode de transformation par immersion des fleurs. Plusieurs plantes transformées ont été obtenues et maintenues en culture *in vitro*.

Dans un second temps, nous avons étudié l'interaction de WAK1 avec les pectines extraites de parois de cellules en culture liquide à différents stades de croissance.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2005

Promoteur: J. Messiaen

Je tiens en premier lieu à remercier le Professeur Van Cutsem de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie également le Professeur Messiaen de m'avoir encadré et donné tant de moyens pour la réalisation de ce travail. Merci également pour sa disponibilité et le temps passé à la correction de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour le temps consacré à la lecture de ce mémoire.

Un grand merci à Annabelle de m'avoir suivi, conseillé et appris tant de choses. Merci également d'avoir répondu à toutes mes questions durant ces six mois.

Merci à Nicolas d'avoir séquencé tant de préparations, et à Françoise Liners de m'avoir aimablement prêté l'anticorps 2F4.

Je tiens également sincèrement à remercier Pierre et Catherine pour les innombrables et judicieux conseils. Merci pour votre sourire quotidien.

Merci à Françoise Lonnoy de m'avoir consacré tant de son précieux temps, d'avoir été si patiente et de toujours rester de bonne humeur (même lorsque je laissais des points dans mes titres !!!)

Enfin, je remercie également Ana-Maria, Juan Carlos, Marie, Mallory, Jayaraj, et Yasmina d'avoir participé à cette expérience de fin d'études.

Je n'oublie pas de remercier les autres mémorants : Marie-Céline, Cristina et Benjamin pour leur bonne humeur et leur gentillesse. J'espère vraiment que cette expérience humaine ne s'arrêtera pas avec la fin de cette période de mémoire.

Il serait déplacé de ma part d'oublier mes parents et mon frère, qui m'ont permis de réaliser ces études, guidé et porté à bout de bras lorsque le besoin s'en faisait sentir. Merci également à ma grand-mère. J'ai également une pensée particulière pour tous ceux qui ont cru en moi mais qui malheureusement ne sont plus là pour voir l'aboutissement de ces études...

Un remerciement tout particulier pour Caro qui a toujours été là, si patiente et aimable,...merci du fond du cœur !

Merci également aux parents de Caro...

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la bonne réalisation de ce mémoire...

Aurélien#

Table des matières

Introduction	4
A. La paroi cellulaire	7
A.1. Notions structurales	1
A.1.1. Les polysaccharides	1
A.1.1.1. Cellulose	2
A.1.1.2. Hémicelluloses	2
A.1.1.3. Pectines	2
A.1.2. Protéines pariétales	6
A.1.2.1. Glycoprotéines de structure	6
A.1.2.2. Enzymes	6
A.2. Signalétique et fragments pectiques	6
A.3. Perception des OGAs	8
B. Les récepteurs kinases	9
B.1. Récepteurs membranaires chez les animaux	10
B.2. Récepteurs membranaires chez les végétaux	10
B.2.1. Phylogénie des récepteurs	10
B.2.2. Receptor-Like Kinase ou récepteur kinasique	11
B.2.2.1. La reconnaissance du soi médiée par les récepteurs kinases locus-S	13
B.2.2.2. L'élongation et la croissance cellulaire médiées par le récepteur BRI1	15
B.2.2.3. Récepteurs impliqués dans l'organogenèse et la morphogenèse : CLAVATA	16
B.2.2.4. Récepteurs impliqués dans la défense contre les pathogènes	17
• B.2.2.4.1. Un exemple de récepteur généraliste : FLS2	18
• B.2.2.4.2. Un exemple de récepteur spécialiste : Xa21	18
B.2.2.5. Récepteurs à domaines type-lectines	19
C. Molécules intervenant dans le pontage paroi cellulaire – membrane plasmique	20
C.1. Protéines assurant un lien entre la MEC et le cytoplasme chez les cellules animales	20
C.2. Protéines assurant un lien entre la MEC et le cytoplasme chez les cellules végétales	21
C.2.1. Les cellulose-synthases	22
C.2.2. Les AGPs	22
C.2.3. Les WAKs ou kinases associées à la paroi	23
C.2.3.1. Introduction	23
C.2.3.2. Expression des WAKs	24
C.2.3.3. Interaction WAK – paroi	25
• C.2.3.3.1. Interaction avec une protéine riche en glycines (GRP)	25
• C.2.3.3.2. Interaction de WAK1 avec la pectine	25
C.2.3.4. Rôles des protéines WAKs	26
• C.2.3.4.1. WAKs et élongation cellulaire	26
• C.2.3.4.2. WAKs et réactions défensives	27
C.2.3.4.2.1. Stress biotiques	27
C.2.3.4.2.2. Stress abiotiques	27
Objectifs	29
MATERIEL et METHODES	23
A. Cultures végétales	30
A.1. Cultures en suspension de cellules: d'Arabidopsis thaliana écotype columbia (A-TL)	30
A.2. Milieux de germination et de culture de plantules d'A.thaliana	30

A.3.	Transformation des fleurs d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
B.	Cultures d' <i>E. Coli</i>	31
B.1.	Milieu LB liquide	31
B.2.	Transformation d' <i>E. Coli</i> TOP 10F' par choc thermique	31
C.	Culture d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404/virG)	31
C.1.	Préparation de cellules électrocompétentes	31
C.2.	Electroporation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
D.	Culture de levures (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) contenant le vecteur pYES2/NT C	32
E.	Méthodes relatives aux acides nucléiques	32
E.1.	Miniprep d'ADN plasmidique	32
E.2.	Electrophorèse sur gel d'agarose (ADN)	34
E.3.	Extraction d'ADN d'un gel d'Agarose	34
E.4.	Purification d'ADN sur colonne « Microcon »	35
E.5.	PCR	35
E.6.	Mutagenèse dirigée	37
E.7.	Réaction de ligation	38
E.8.	Réaction de séquençage	38
F.	Méthodes relatives aux protéines	39
F.1.	Dosage par la méthode Bradford	39
F.2.	Migration sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et Western Blot	40
F.2.1.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS	40
F.2.2.	Coloration des protéines au bleu de Coomassie	40
F.2.3.	Western blot – semi-dry	40
F.3.	Expression d'une protéine totale produite en levure	41
F.4.	Extraction de protéines produites en levure	41
F.5.	Purification de protéines recombinantes sur colonne Ni-NTA	41
F.6.	Tests d'interaction (ELISA)	42
F.6.1.	ELISA non compétitifs	42
F.6.2.	ELISA compétitifs	43
F.6.2.1.	Interaction entre WAK ₆₇₋₂₅₄ et la pectine	43
F.6.2.2.	Interaction entre l'anticorps 2F4 et la pectine	43
G.	Méthode relatives aux polysaccharides	44
G.1.	Extraction de fractions pectiques	44
G.2.	Dosage des sucres totaux par dot sur plaque de silice	44
G.3.	Dosage des acides uroniques par la méthode du métahydroxybiphényle	44
G.4.	Protocole HPLC-PAD	45
	RESULTATS ET DISCUSSION	36
A.	Construction de récepteurs hybrides et transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
A.1.	Préambule	46

A.2.	Schéma expérimental suivi	47
A.3.	Clone initial	47
A.4.	Ajout d'un tag polyhistidine (HIS ₆)	49
A.5.	Conception de versions mutées des récepteurs hybrides	50
A.5.1.	Choix des mutations	50
A.5.1.1.	Mutations au niveau du domaine extracellulaire de WAK1 du récepteur hybride	50
A.5.1.2.	Mutation au niveau du domaine intracellulaire de BRI1 du récepteur hybride	52
A.5.2.	Obtention des versions mutées du récepteur hybride	52
A.6.	Transformation de fleurs d' <i>A. thaliana</i>	56
A.6.1.	Clonage de WAK1/BRI1/HIS6 et de ses versions mutées dans le vecteur PBI-121	56
A.6.2.	Transformation des <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
A.6.3.	Transformation de fleurs d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
A.6.4.	Germination et sélection des plantules d' <i>A. thaliana</i> transformées	61
B.	Etude de la liaison WAK1/pectine	63
B.1.	Préparation de WAK ₆₇₋₂₅₄	63
B.2.	Isolement de fractions pectiques de cellules en suspension d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
B.2.1.	Dosage des sucres totaux dans les fractions pectiques	66
B.2.2.	Dosage des acides uroniques dans les fractions pectiques	66
B.3.	Principe de l'ELISA compétitif	67
B.3.1.	ELISA compétitif avec la protéine WAK ₆₇₋₂₅₄	67
B.3.2.	ELISA compétitif avec l'anticorps monoclonal 2F4	68
B.3.3.	Contrôles	68
B.3.4.	Etablissement d'une courbe de compétition en présence de pectines commerciales	68
B.3.5.	Résultats des ELISAs compétitives en présence des pectines extraites des parois d' <i>A. thaliana</i>	69
B.3.5.1.	Résultats de l'ELISA compétitif avec WAK ₆₇₋₂₅₄ et FP	69
B.3.5.2.	Résultats de l'ELISA compétitif avec l'anticorps 2F4 et les FP	70
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		71
BIBLIOGRAPHIE		54

INTRODUCTION

A. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire correspond à une structure entourant, reliant et protégeant les cellules végétales. La structure pariétale est composée à 90% de polysaccharides (~30% cellulose, 30% hémicelluloses, 35% pectines) et à 2 à 10% de (glyco)protéines. S'y retrouvent également moins de 2% d'esters phénoliques, 1 à 5% de minéraux (Fig.1). Notons enfin que l'eau constitue souvent plus de 60% du volume total pariétal.

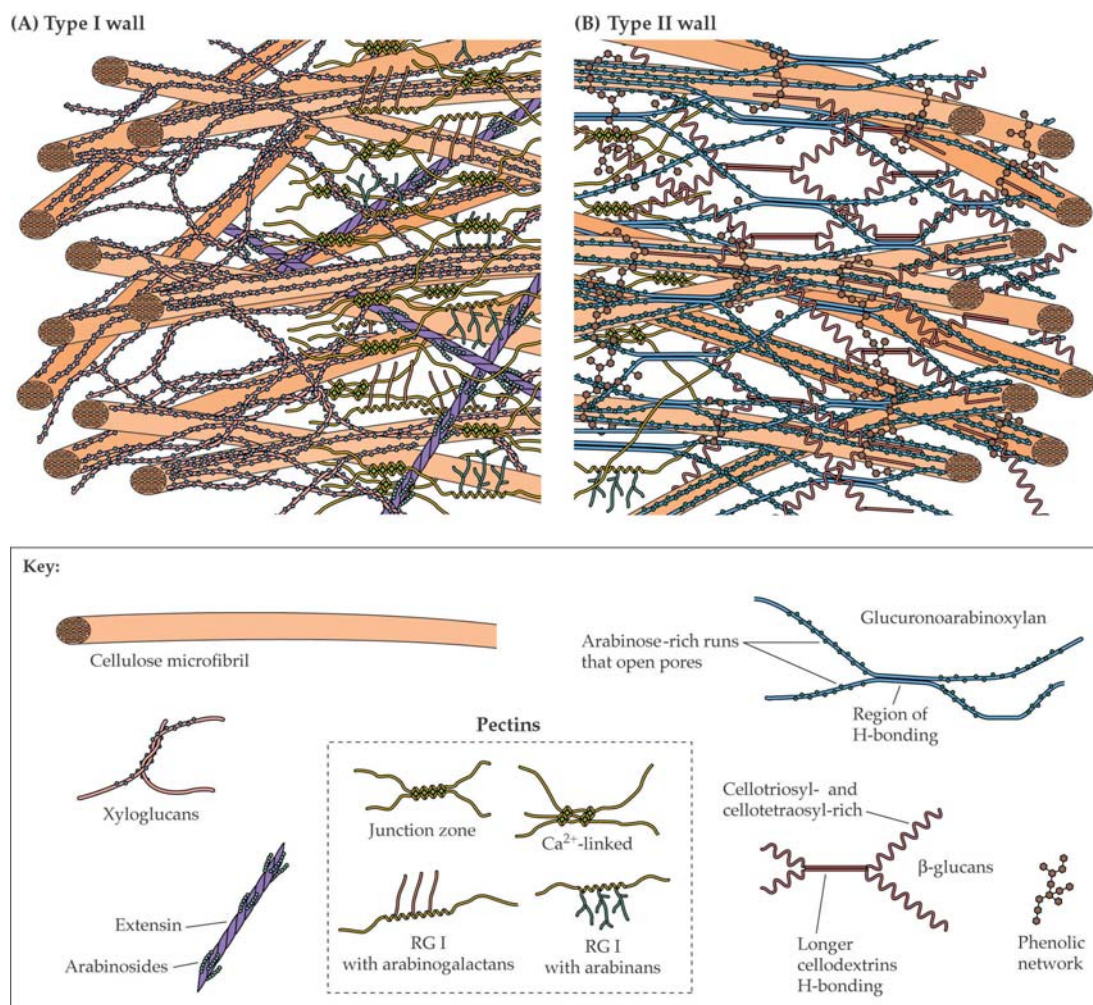


Fig.1: Modèle de la paroi cellulaire selon Carpita et *al.*, 1993.

A.1. Notions structurales

A.1.1. Les polysaccharides

La paroi végétale est composée de trois polysaccharides majeurs que sont les fibres de cellulose, les hémicelluloses et les pectines.

A.1.1.1. Cellulose

La cellulose est un polymère de β 1,4 D-glucose synthétisé via des cellulose-synthases complexées en rosettes au niveau de la membrane plasmique. Les celluloses synthases favorisent la polymérisation du précurseur de la cellulose : l'UDP-glucose. Les polymères cellulotiques s'associent via des ponts hydrogènes pour former des microfibrilles de 0,5 μ m de diamètre, formant ainsi un réseau cristallin au sein de la paroi cellulaire (Delmer et Amor, 1999 ; Raven *et al*, 2000).

A.1.1.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses constituent un groupe hétérogène de polysaccharides branchés avec une armature linéaire (β 1-4). Le terme « hémicellulose » est généralement utilisé pour décrire une famille de polymères riches en glucose, xylose ou mannose avec des chaînes latérales où xylose, galactose et fucose prédominent. Le groupe des hémicelluloses est subdivisé en trois groupes principaux. Les xyloglucanes, hémicelluloses les plus abondantes, sont formées d'un squelette de glucoses et de chaînes latérales de xyloses ou de xyloses-galactoses-fucoses. Les xylanes sont constituées d'un squelette de xyloses avec des chaînes latérales variables comprenant de l'arabinose, du xylose et du galactose. Les mannanes et les glucomannanes comprennent une ossature de mannoses et de mannoses-glucoses respectivement avec des ramifications assez variables mais souvent constituées de galactoses. La composition des hémicelluloses varie fortement entre mono-et dicotylées, mais également selon le type cellulaire, le stade de développement ou encore l'espèce (O'Neil et York, 2003 ; Ridley *et al*, 2001).

La structure branchée de ces polysaccharides permet aux hémicelluloses de réaliser un lien par des ponts hydrogènes avec les microfibrilles cellulotiques, réalisant de ce fait une liaison entre les microfibrilles de cellulose et la matrice de la paroi cellulaire.

Contrairement aux celluloses, les hémicelluloses sont sécrétées dans la paroi cellulaire via le système endomembranaire (Ridley *et al*, 2001 ; Cosgrove, 2001).

A.1.1.3. Pectines

Les pectines sont des polysaccharides relativement hydratés et ainsi implicitement hydrophiles contenant, par définition de l'acide α -D-galacturonique en liaison α -1,4-. Ces acides polygalacturoniques se distinguent par la composition de leurs chaînes latérales comprenant souvent de l'arabinose, du galactose ou un arrangement complexe de monosaccharides (Cosgrove, 1997). Dix-sept monosaccharides différents composent les trois domaines pectiques principaux que sont l'homogalacturonane (HG) et les rhamnogalacturonanes I et II (RG I et II) (Fig.2). Ces polymères constituent le réseau pectique (Ridley *et al*, 2001 ; Vincken *et al*, 2003).

Le polysaccharide pectique le plus abondant est le RG I, dont la chaîne principale est constituée d'une alternance d'acides galacturoniques et de rhamnoses, ces derniers étant substitués en C-4 par des sucres neutres (comme l'arabinose et le galactose) ou des oligosaccharides acides (Ridley *et al*, 2001). Les chaînes latérales les plus courantes du RG-I sont les arabinanes et les arabinogalactanes (AG-I).

Les deux autres composants pectiques majeurs possédant une ossature d'acides galacturoniques liés en α -1,4- sont l'homogalacturonane (HG) et le rhamnogalacturonane II (RG-II). Le premier est composé de 100 à 200 acides galacturoniques ; le second, par une ossature de neuf acides galacturoniques sur laquelle sont greffées des chaînes latérales pouvant comprendre entre autres de l'arabinose, de l'acide galacturonique, de l'acide acétique, de l'apirose, du KDO (acide 2-kéto-3-déoxy-D-manno-octulosonique) (Ridley *et al*, 2001).

2001 ; Willats *et al.*, 2001). Des ions bores interviennent également dans le pontage de deux molécules de rhamnogalacturonane II (RG-II) (Ishii et Matsunaga, 2001).

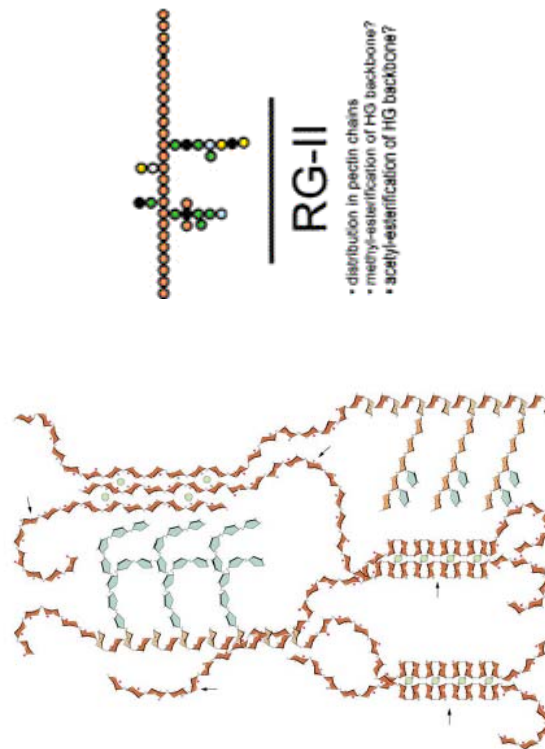


Fig.3: Schématisation des zones lisses et hérissées au sein du réseau pectique. La porosité du réseau pectique est fonction du degré de méthyl-esterification, de la longueur des chaînes d'arabinoses, galactoses et arabinogalactoses attachées aux RGI. Les pores permettent la formation de poches d'hydratation ainsi que le passage de petites molécules (Carpita et McCann, 2000).

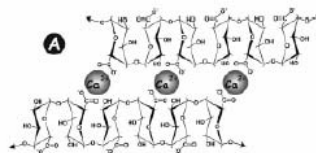


Fig.4: Représentation schématique de la conformation en « boîte à œufs » entre deux zones homogalacturoniques (Vincken *et al.*, 2003).
Un pontage inter-chaînes est réalisé suivant un processus coopératif par des ions calcium bivalents permettant ainsi la formation de gels pectiques.

Le réseau pectique, dont l'ossature est principalement constituée de HG et RGI, peut être subdivisé en deux régions « morphologiquement » distinctes. La première, constituée d'HGs non branchés est nommée « région lisse » ; la seconde, de par sa composition en RGI fortement branchés, « région hérissée » (Fig.3). Cette dernière, de par sa structure, permet d'expliquer, en partie, l'hydratation de la paroi cellulaire. La position du RGII est plus problématique dans ce réseau (Visser et Voragen, 1996).

Comme pour les hémicelluloses, la sécrétion des pectines se déroule par l'intermédiaire du système endomembranaire, permettant ainsi au réseau pectique de s'intercaler, ou plus

précisément, de constituer une réelle matrice entre cellulose et hémicelluloses (Carpita et Gibeaut, 1993). Les polysaccharides pectiques sont déposés de façon tissu-spécifique. De plus, ce sont des « épitopes » pectiques différents qui sont déposés à différents stades du développement. Les HGs synthétisés dans l'appareil de Golgi sont déposés dans la paroi cellulaire sous une forme partiellement acétylée en C2 et C3 et en partie estérifiée sur le carboxyle 6 (O'Neil et York, 2003). Durant le développement de la plante, les groupements méthylesters sont retirés par des pectines méthylestérases afin de laisser des charges négatives sur la pectine, permettant ainsi le pontage des chaînes pectiques via des ions calcium. En effet, les homogalacturonanes dé-estérifiés peuvent s'associer entre-eux de manière coopérative via des ions Ca^{2+} et ainsi adopter une conformation dite en « boîte à œufs » (« egg-box »)-(Fig.4) (Liners *et al.*, 1992).

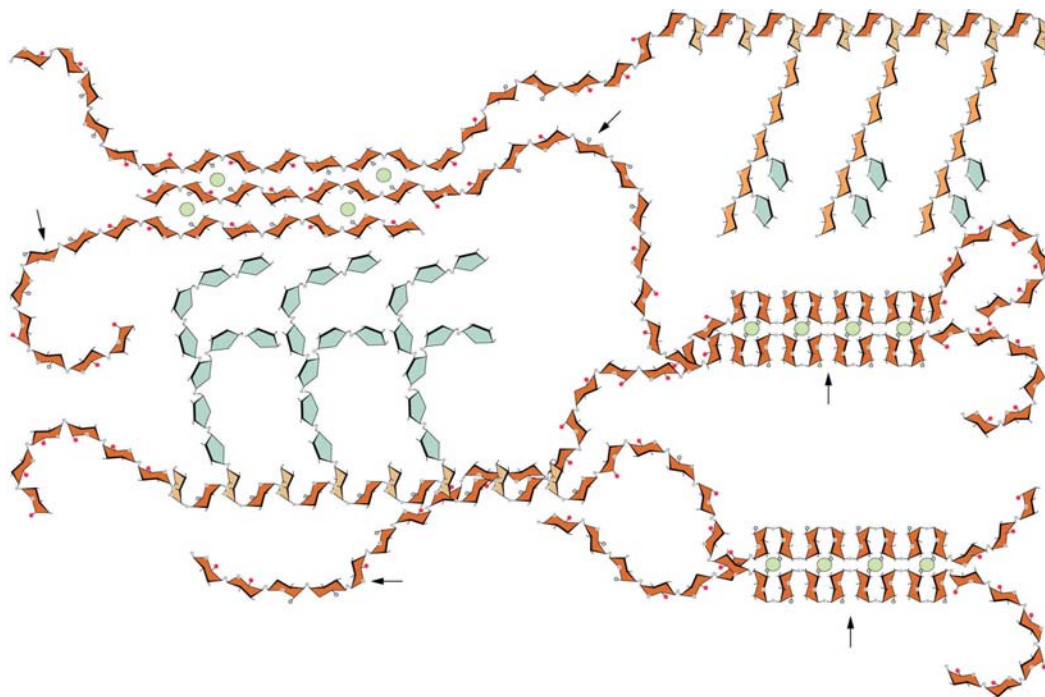


Fig.3: Schématisation des zones lisses et hérissées au sein du réseau pectique. La porosité du réseau pectique est fonction du degré de méthylestérification, de la longueur des chaînes d'arabinoses, galactoses et arabinogalactoses attachées aux RGI. Les pores permettent la formation de poches d'hydratation ainsi que le passage de petites molécules (Carpita et McCann, 2000).

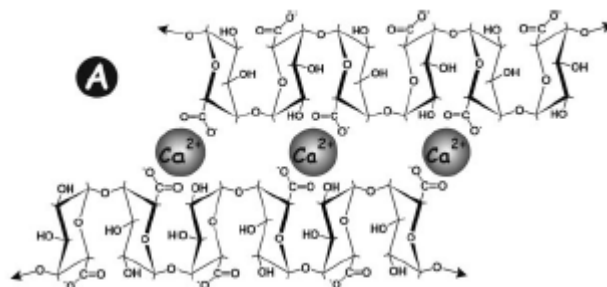


Fig.4: Représentation schématique de la conformation en « boîte à œufs » entre deux zones homogalacturoniques (Vincken *et al.*, 2003).

Un pontage inter-chaînes est réalisé suivant un processus coopératif par des ions calcium bivalents permettant ainsi la formation de gels pectiques.

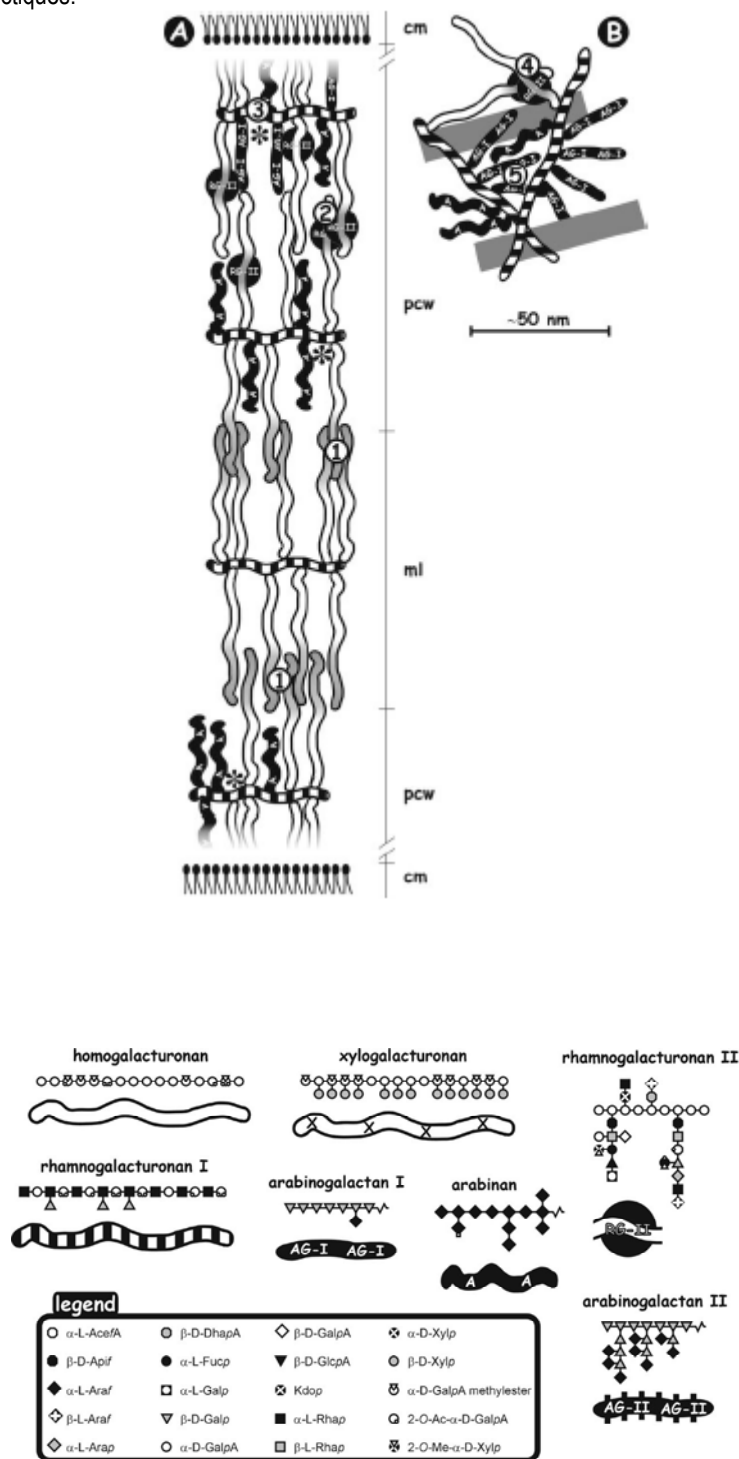


Fig.5: Modèle alternatif du réseau pectique au sein de la paroi cellulaire primaire et de la lamelle mitoyenne (selon Vincken *et al.*, 2003). Le schéma A./ montre les parois primaires de deux cellules voisines séparées par la lamelle mitoyenne. Le rôle de squelette de la structure pariétale est tenu par les RGI, les chaînes d'acides homogalacturoniques et de RGII n'en étant que les ramifications. Les chaînes latérales AG-I et arabinanes combinent les interstices dans la structure pariétale (bien observé si vue du haut en B./), remplissant ainsi un rôle important dans le contrôle de la porosité de la paroi cellulaire.

Un modèle alternatif de paroi a été proposé (Fig.5) (Vincken *et al.*, 2003). Ce nouveau modèle de paroi cellulaire serait en accord avec la formation de la lamelle mitoyenne, la

présence de microdomaines d'homogalacturonanes particuliers au sein de la paroi et le contrôle de l'épaisseur de la paroi. Dans ce modèle, les pectines sont toujours constituées de régions lisses et hérissées, mais le polymère central est le RG-I. Celui-ci porterait des chaînes latérales d'acides homogalacturoniques (HG) pouvant se lier entre elles via des ions calcium et/ou des chaînes latérales d'arabinanes, galactanes et/ou arabinogalactanes. Les RG-II liés à des HG différents, favoriseraient, via des ions bores, le pontage de différentes macromolécules pectiques renforçant le gel calcique.

A.1.2. Protéines pariétales

Les protéines de la paroi cellulaire peuvent être classées selon leur aptitude à lier des polysaccharides pariétaux sécrétés (Kohorn, 2000), plus grossièrement en protéines de structure et en enzymes (Josè-Estanyol *et al.*, 2000).

A.1.2.1. Glycoprotéines de structure

La majeure partie des glycoprotéines de structure comprend les glycoprotéines riches en hydroxyprolines ou HRGP (Showalter, 1993) telles les extensines (Josè-Estanyol *et al.*, 2000) servant à la rigidification de la paroi en réponse à un pathogène ; les glycoprotéines riches en prolines (Showalter, 1993) impliquées dans le stress oxydatif et la rigidification de la paroi suite à une invasion par un pathogène ; les glycoprotéines riches en glycine ou GRP (Sacchetto-Martins *et al.*, 2000) ; les arabinogalactanes ou AGP (Oxley et Bacic, 1999 ; Majewska-Sawka et Nothnagel, 2000) ; les kinases associées à la paroi ou WAK (He *et al.*, 1996, 1999) ; les lectines (Herve *et al.*, 1999) ; et les expansines (Cosgrove, 1997), des agents déstructurants de la paroi augmentant la plasticité pariétale mais dépourvus d'activités enzymatiques (Cosgrove, 2001).

A.1.2.2. Enzymes

Les nombreuses enzymes pariétales sont habituellement classées selon leur activité enzymatique. On y retrouve les enzymes hydrolytiques (endo/exo-O-glycosylhydrolases, carbohydrates estérases) clivant des liens glycosidiques ou agissant sur des esters carboxyliques ; les transglycolases (xyloglucanase endoglycosyltransférase,...) clivant des liens glycosidiques et transférant le résidu vers un autre sucre ; les lyases clivant les liaisons α -1,4- entre acides uroniques par β -élimination ; les oxydoréductases (oxydases, peroxydases) intervenant entre autres dans la dégradation de la paroi.

De nombreuses enzymes pariétales sont également impliquées dans la défense contre les pathogènes, comme par exemple les glucanases, les chitinases, PGIP (polygalacturonase inhibiting protein)... (Fry, 1995 ; Josè-Estanyol *et al.*, 2000 ; Brummel *et al.*, 2001).

A.2. Signalétique et fragments pectiques

Comme nous venons de le voir, la paroi cellulaire constitue un réseau de polysaccharides de hauts poids moléculaires liés entre eux via des interactions ioniques et covalentes. Elle est donc une barrière physique qui protège la cellule, entre autres, contre la pénétration d'agents pathogènes (Mellersh et Heath, 2001).

De la complexité de la paroi naquit l'idée que certains composants de celle-ci pourraient servir de molécules signal (éliciteurs) latentes relâchées lors d'une attaque pathogène. C'est dans les années 70s qu'Albersheim découvrit que des fragments pariétaux de champignon induisaient la production de phytoalexines (les « antibiotiques » des végétaux) chez des plantes non infectées. Le nom d'« oligosaccharines » fut donné à toute molécule pouvant ainsi induire une réponse de défense (Vorwerk *et al.*, 2004).

La paroi cellulaire végétale contient également des oligosaccharines. En effet, les pectines de la paroi cellulaire sont le premier point d'attaque pour des pathogènes qui tentent de la fragiliser via des enzymes telles les pectates lyases et les polygalacturonases (Mellersh et Heath, 2001). Les acides oligogalacturoniques (OGAs) libérés par ces enzymes, molécules linéaires d'acides α -1,4- galacturoniques ont été les premières oligosaccharines endogènes découvertes. De nombreuses réponses biologiques déclenchées par des OGAs ont été répertoriées. Ces réponses sont cependant différentes selon les espèces végétales, les bio-essais et la mixture des OGAs utilisés. Les réponses biologiques des plantes envers les OGAs peuvent être divisées en deux catégories : des réponses défensives et des réponses morphogénétiques (croissance et développement) (pour revue : Ridley *et al.*, 2001 ; Spiro *et al.*, 1998).

Les réponses défensives induites par les OGAs comprennent la synthèse de protéines PR (pathogenesis-related) et de peptides toxiques, ainsi que la production de ROS (reactive oxygen species) tels que H_2O_2 et O_2^- . L'ensemble de ces réponses est nommé choc oxydatif, est effectif en quelques minutes dans des cellules en suspension de soja, tabac, et tomate. L'application exogène d'OGAs induit la production de phénylalanine ammonia lyase (PAL) (dans des cellules en suspension de carottes et de tabac ainsi que dans des cotylédons de haricots), l'accumulation de phytoalexines (dans des cotylédons de soja, de haricot, de pois et dans des cellules en suspension de persil) et à la lignification de la paroi cellulaire. Cette lignification permet, en conjonction avec les peroxydases, l'accumulation d'HRGP, un renforcement de la structure pariétale (hypocotyles de concombre, et des cotylédons de haricot). L'induction de l'ouverture des stomates par la lumière est également inhibée par les OGAs (chez la tomate et *Commelina communis*). Les OGAs régulent aussi l'expression de plusieurs enzymes comme la chitinase, l'endopolygalacturonase ou le PGIP (endopolygalacturonase inhibiting protein) (pour revue : Ridley *et al.*, 2001 ; Spiro *et al.*, 1998). En présence de Ca^{2+} , les OGAs induisent également une dépolarisation membranaire, une alcalinisation du cytosol, une augmentation de l'activité du calcium cytosolique et de la transcription de gènes de défense (Walker-Simmons *et al.*, 1984 ; Robertson, 1986 ; Davis et Hahlbrock, 1987 ; Bruce et West, 1989 ; Tepper et Anderson, 1990 ; Moloshok *et al.*, 1992 ; Legendre *et al.*, 1993 ; Messiaen et Van Cutsem, 1994 ; Low et Merida, 1996 ; Rout-Mayer *et al.*, 1997 ; Binet *et al.*, 1998 ; Lapous *et al.*, 1998 ; Stennis *et al.*, 1998 ; Côté *et al.*, 1998 ; Bolwell, 1999 ; pour revue : Ridley *et al.*, 2001).

Les réponses morphogénétiques induites par les OGAs régulent la croissance et le développement de tissus végétaux et, à l'exception du mûrissement des fruits, ont un effet opposé à celui d'un ajout d'auxine. Cependant, le mécanisme par lequel les OGAs agissent en opposition à l'auxine sont toujours inconnus (Ridley *et al.*, 2001). Les OGAs favorisent ainsi l'inhibition de l'élongation de la tige de pin induite par l'auxine et la formation de racines et de stomates chez des explants foliaires de tabac. Les OGAs sont également impliqués dans le mûrissement de fruits via la production d'éthylène (chez la tomate et le citron) (Pour revue : Ridley *et al.*, 2001).

Les réponses biologiques citées ci-dessus ont principalement été obtenues avec des mélanges d'OGAs (Mohnen *et al.*, 1990 ; Campbell et Labavich, 1991 ; Bellincampi *et al.*, 1993 ; Côté et Hahn, 1994 ; Bellincampi *et al.*, 1996 ; Altamura *et al.*, 1998 ; Bellincampi *et al.*, 2000 ; Ridley *et al.*, 2001). En utilisant des fractions d'OGAs purifiés, il a été possible de montrer que la plupart des réponses biologiques engendrées sont attribuées à des OGAs de DP (degré de polymérisation) entre 9 et 16. La taille minimale des OGAs requise pour engendrer la majorité des réponses biologiques correspond à la taille minimale permettant l'adoption calcium-dépendante d'une conformation en « boîte à œufs » (Ridley *et al.*, 2001 ; Messiaen et Van Cutsem, 1994 ; Liners *et al.*, 1992). Certains polycations tels que les polyamines sont capables de perturber l'adoption de cette conformation en « boîte à œufs » et ainsi de moduler l'activité biologique des OGAs (Messiaen et Van Cutsem, 1999).

Des OGAs de plus petite taille promeuvent l'expression d'inhibiteurs de protéinases (activité optimale pour les OGAs de DP 2). Des OGAs de DP compris entre 2 et 6 induisent la production d'éthylène chez la tomate (activité optimale pour les OGAs de DP 5) (Ridley *et al.*, 2001).

A.3. Perception des OGAs

Même si les effets des OGAs sur la physiologie des cellules végétales sont bien caractérisés et que leur extrémité réductrice semble un élément clé dans leur reconnaissance par les cellules végétales (Spiro *et al.*, 1998), aucun récepteur aux OGAs n'a été découvert. Etant donné la gamme d'activités biologiques attribuée aux OGAs, il ne serait pas surprenant que de multiples mécanismes soient impliqués dans leur perception. L'éventualité d'un rôle récepteur joué par la paroi elle-même a été envisagée. La perception se ferait par une variation de tension au sein des polymères pariétaux induite par les OGAs. Celle-ci se transmettrait au cytosquelette et initierait une cascade de transduction du signal via des protéines transmembranaires (Ridley *et al.*, 2001).

Une première protéine-candidate pouvant interagir avec les OGAs a été détectée chez la pomme de terre. Cette protéine de 34 kDa, nommée rémorine, est phosphorylée sur un résidu thréonine suite à l'application d'OGAs. Cette protéine intracellulaire co-purifie probablement avec une Sérine/Thréonine (Ser/Thr) kinase membranaire qui pourrait être « le » récepteur des OGAs et qui phosphorylerait la rémorine. La rémorine serait plutôt une protéine intervenant dans la signalisation et la communication intercellulaire (Reymond *et al.*, 1996) et serait également associée au cytosquelette sous forme d'une superstructure multimérique intervenant dans la signalisation lors d'une réponse défensive ou durant le développement (Bariola *et al.*, 2004).

Horn et ses collaborateurs (1989) ont montré une internalisation des OGAs par des cellules de soja. Des OGAs marqués radioactivement, ou couplés à FITC (fluorescein isothiocyanate), sont internalisés de manière spécifique vers la vacuole. Le processus d'internalisation nécessitait de l'énergie et était saturable, deux caractéristiques de l'endocytose médiée par récepteurs chez les cellules animales. Cependant, aucun récepteur d'OGA n'a pu être isolé dans ce contexte.

Un rôle crucial d'une protéine kinase dans la réponse aux OGAs (augmentation de la concentration en calcium cytosolique) a ensuite été proposé (Navazio *et al.*, 2002). Navazio a mis en évidence qu'une élévation aux OGAs est suivie d'une période de désensibilisation envers les OGAs. L'utilisation d'inhibiteur de kinase restaurait la réponse des cellules, tandis qu'un inhibiteur de phosphatase prolongeait la période réfractaire. Cette désensibilisation est une réponse typique d'un récepteur (Navazio *et al.*, 2002).

Enfin, Kohorn (2001) et Decreux et Messiaen (2005) ont mis en évidence une interaction entre la pectine WAK1 (Wall-associated kinase), une protéine (récepteur) kinase (RLK) impliquée dans la défense contre les pathogènes (He *et al.*, 1998). Les WAKs apparaissent actuellement comme les meilleurs candidats pour percevoir les OGAs et initier une cascade de transduction du signal. Les récepteurs WAKs seront abordés dans un point ultérieur de cette introduction.

Dans le chapitre suivant, nous allons passer en revue, de manière non exhaustive, le fonctionnement de quelques récepteurs kinases de plantes.

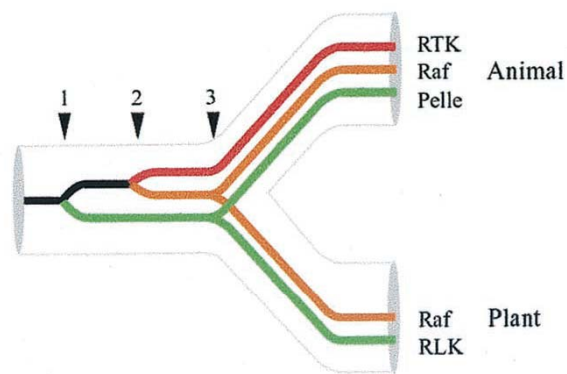


Fig.6: Arbre phylogénétique des récepteurs kinases proposant une divergence évolutive indépendante entre les règnes animal et végétal. Trois grands événements du point de vue moléculaire ont été répertoriés : le premier correspondant à une duplication du matériel génétique permettant une séparation des récepteurs tyrosine kinases et sérine/thréonine kinases ; le second étant une duplication des gènes autorisant une différenciation entre les Raf kinases et les tyrosine kinases ; le dernier séparant les récepteurs animaux des végétaux (Shiu *et al.* 2001).

B. Les récepteurs kinases

La capacité de percevoir et de réagir face à des signaux endo- ou exogènes via des récepteurs situés en surface de cellules constitue une propriété fondamentale de tout système vivant (Shiu et Bleecker, 2001). Suite à cette perception d'un signal, une voie de transduction du signal est déclenchée bien souvent via une cascade de kinases.

De récents projets de séquençages du génome d'*Arabidopsis thaliana* ont découvert un nombre important de séquences encodant des récepteurs et plus particulièrement des récepteurs kinases (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Cependant, la majorité de ces récepteurs sont encore, à l'heure actuelle, doublement orphelins, c'est-à-dire que ni le ligand ni la voie de transduction déclenchée ne sont connus.

Les récepteurs situés majoritairement en surface de cellules végétales appartiennent à des familles de récepteurs pour la plupart absentes chez les cellules animales (Shiu *et al.*, 2001 ; Cock *et al.*, 2002). Ces deux types de cellules doivent en effet faire face à des signaux intra- et extracellulaires aussi complexes que différents (Lease *et al.*, 1998). Le séquençage du génome d'*A.thaliana* a même révélé l'existence de séquences codant pour des récepteurs à deux composants membranaires ou solubles similaires à ceux des bactéries et des levures comme, par exemple, les récepteurs à l'éthylène (Schaller, 2000 ; Urao *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2002 ; Guo et Ecker, 2004)

B.1. Récepteurs membranaires chez les animaux

Les récepteurs membranaires majoritaires chez les animaux sont les récepteurs à protéines G composés de sept domaines transmembranaires. D'autres classes de récepteurs abondants chez les cellules animales, les récepteurs à Tyrosine (Tyr) kinases ou phosphatases, et les récepteurs à guanylate cyclases, sont absentes chez les végétaux. Par contre, les récepteurs à Ser/Thr kinases sont hyper-représentés chez les plantes avec 417 récepteurs putatifs. Chez les cellules animales, seuls les récepteurs TGF β sont des récepteurs à Ser/Thr kinases (Hardie, 1999 ; Cock *et al.*, 2002).

B.2. Récepteurs membranaires chez les végétaux

B.2.1. Phylogénie des récepteurs

Avant de rentrer plus amplement dans la problématique des récepteurs, une étude phylogénétique des récepteurs kinases montre une divergence évolutive indépendante des familles de récepteurs kinases entre les règnes animal et végétal (Shiu *et al.*, 2001 ; Cock *et al.*, 2002).

Trois grands événements évolutifs ont été proposés: le premier correspondrait à une duplication du matériel génétique aboutissant à une divergence des récepteurs Ser/Thr kinases par rapport aux récepteurs à Tyr kinases ; le deuxième, à une duplication conduisant à une différenciation entre les Raf kinases et les récepteurs à Tyr kinases ; le troisième, à la séparation entre lignées animales et végétales (Fig.6).

La lignée végétale se caractérise essentiellement par des récepteurs Ser/Thr kinases, initialement nommés RLKs (Recceptor-Like Kinase).

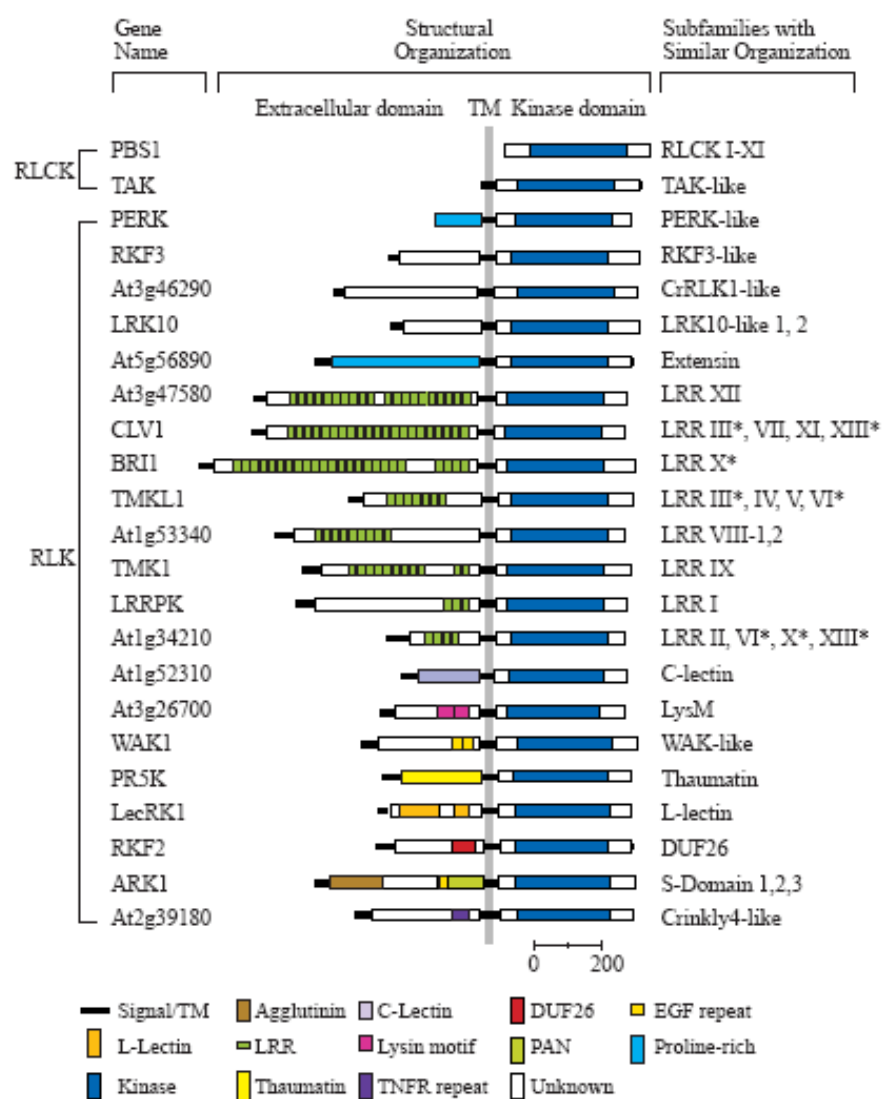


Fig.7: Représentation de différentes famille de récepteurs à Ser/Thr kinases des cellules végétales et classés en fonction de leur domaine extracellulaire (Shiu et *al.*, 2001).

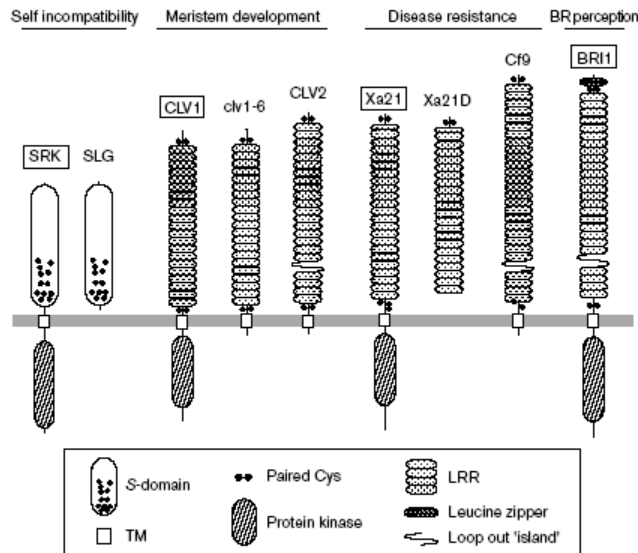


Fig.8: Topologie des RLKs (receptor-like kinases) selon Torii (2000). Un grand nombre de RLKs sont composés d'une partie extracellulaire faiblement conservée avec un nombre de répétitions leucines variable, responsable de la spécificité de ligand, d'une région transmembranaire, et d'une partie intracellulaire kinase fortement conservée. Les cystéines délimitant les LRRs sont présumées faciliter la dimérisation. clv1-6 et Xa21D sont respectivement des mutants de CLV1 et Xa21.

SRK : S-locus receptor kinase
 SLG : S-locus glycoprotein
 CLV : CLAVATA
 BRI1 : BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1

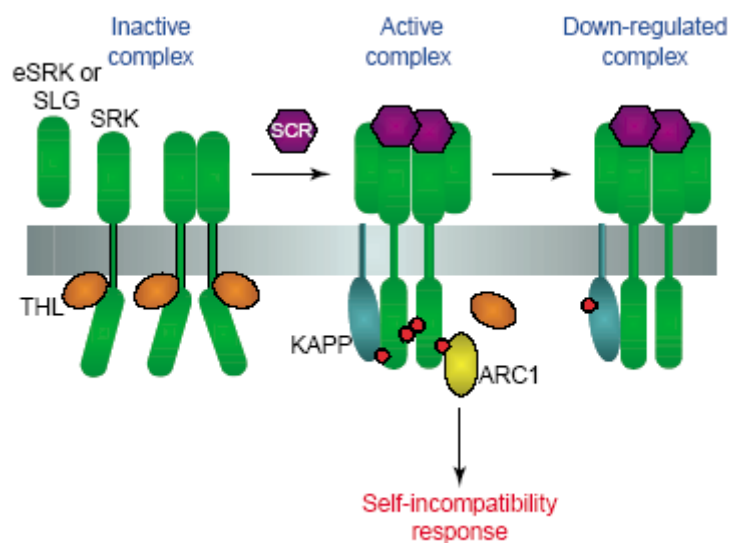


Fig.9: Modélisation du système de l'incompatibilité pollinique médiée par le récepteur SRK. En absence de pollen, le récepteur SRK (S-locus receptor kinase) est monomérique et maintenu inactif par une THL (Thiorédoxine H-like) empêchant l'autophosphorylation du domaine kinase. En cas de self-pollinisation (autofécondation), il y a oligomérisation et transphosphorylation du récepteur induite par le ligand SCR (S-locus cysteine rich). La protéine ARC1 est ensuite phosphorylée et médie la voie de transduction menant à la l'incompatibilité au soi est déclenchée. THL : ARC1 : Armadillo-repeat-containing 1. (Tichtinsky, 2003).

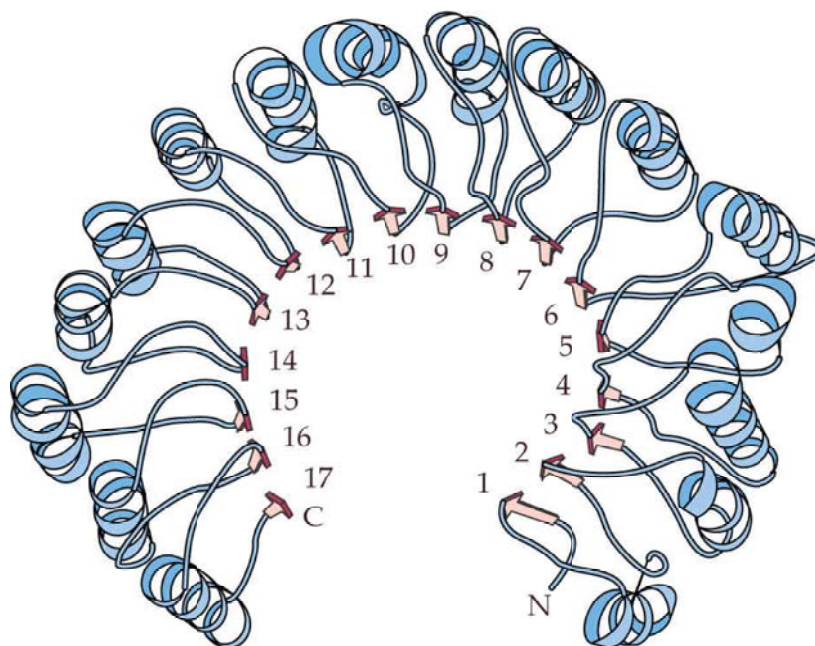


Fig.10: Représentation d'un domaine riche en leucines (LRR). Les domaines LRR présentent typiquement des alternances d'hélices α et de feuillets β . Ce type de domaine est spécialisé dans l'interaction protéine-protéine.

B.2.2. Receptor-Like Kinase ou récepteur kinasique

Dans le génome d'*Arabidopsis*, au moins 610 gènes codent putativement pour des récepteurs type kinase ou RLK (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000 ; Morris et Walker, 2003). Des homologues de ces récepteurs kinases sont répertoriés dans plus de 20 espèces de plantes. Parmi ces RLKs, 417 sont des récepteurs transmembranaires.

Ces RLKs sont caractérisés par trois domaines principaux : un domaine extracellulaire N-terminal débutant par un peptide signal et probablement impliqué dans la perception du signal ; un domaine transmembranaire ; et un domaine intracellulaire de type kinase probablement impliqué dans l'activation de cascade(s) de transduction du signal dans le cytoplasme.

Le domaine kinase étant relativement bien conservé au sein d'une espèce, c'est la partie extracellulaire du récepteur qui sert généralement à établir une classification (Fig.7) (Lease *et al.*, 1998 ; Hardie, 1999 ; Montesano *et al.*, 2003). Les récepteurs RLKs actuellement les mieux connus sont impliqués dans les réponses hormonales stéroïdiennes, la différenciation cellulaire, la croissance et le développement de la plante, la reconnaissance du soi et les interactions plantes-pathogènes (Kohorn, 1999 ; Torii *et al.*, 2000 ; Hardie, 2000 ; Becraft, 2002 ; Morris et Walker, 2003 ; Tichtinsky *et al.*, 2003 ; Haffani *et al.*, 2004).

Les paragraphes suivants présentent de façon non exhaustive quelques récepteurs RLKs végétaux parmi les mieux caractérisés.

B.2.2.1. La reconnaissance du soi médiée par les récepteurs kinases locus-S

Les récepteurs locus S sont impliqués dans « l'incompatibilité pollinique au soi » afin de promouvoir l'allogamie et d'éviter l'autofécondation.

Ces récepteurs sont composés d'un domaine S extracellulaire (homologue d'une glycoprotéine intervenant dans la reconnaissance des grains de pollen à la surface du pistil des fleurs et contrôlant les phénomènes d'autofécondation), d'une région transmembranaire et d'un domaine intracellulaire Ser/Thr kinase. Le domaine S est caractérisé par 12 résidus cystéine dont dix sont conservés (Fig.8) au sein d'une séquence consensus

CX5CX5CX7CXCX_nCX7CX_nCX3CX3CXCX_nC. Ces résidus cystéine faciliteraient l'homo- ou l'hétérodimérisation du récepteur. La séquence codant le domaine S est le locus S comprenant un très grand nombre d'allèles se trouvant à la base de la diversité individuelle. Chez *Brassica oleracea* par exemple, 60 locus S ont été répertoriés (Torii *et al.*, 2000 ; Hardie, 2000 ; Becraft, 2002 ; Kachroo *et al.*, 2002 ; Tichtinsky *et al.*, 2003).

La glycoprotéine S (SLG ; S-locus glycoprotein), également polymorphe et sécrétée par les cellules du stigmate, contient une séquence en acides aminés similaire mais non identique au domaine extracellulaire S du récepteur Ser/Thr kinase transmembranaire SRK (S-locus receptor kinase ; déterminant femelle majeur). SLG et SRK sont localisés à la surface du stigmate et interagissent avec une protéine de surface du grain de pollen riche en cystéines (SCR ; S-locus cysteine rich ; déterminant mâle). Leur interaction résulte en une compatibilité (locus S différents) ou incompatibilité (locus S identiques) pollinique (Takasaki *et al.*, 2000 ; Becraft, 2002 ; Cock *et al.*, 2002 ; Kachroo *et al.*, 2002 ; Hiscock *et al.*, 2003 ; Tichtinsky *et al.*, 2003).

En absence de pollen, le récepteur SRK est sous forme monomérique ou homodimérique et maintenu inactif par THL (thioredoxine H-like) qui empêche l'autophosphorylation du domaine kinase. En cas d'autofécondation (Fig.9), le ligand SCR induit l'homodimérisation de SRK ou l'hétérodimérisation de SLG et de SRK. Suite à cette oligomérisation, SRK est activé par autophosphorylation et active par phosphorylation la protéine ARC1 (Armadillo-repeat-containing 1) et la phosphatase KAPP (Kinase-Associated Protein Phosphatase). ARC1 est un effecteur positif de la self-incompatibilité contenant un motif de polyubiquitination identifié initialement chez la levure. Le rôle exact de ARC1 n'est pas encore élucidé mais ARC1-P pourrait agir comme une ubiquitine ligase greffant des ubiquitines sur des facteurs de croissance du grain de pollen qui seraient ensuite dégradés par le signalosome COP9. D'un point de vue plus physiologique, en cas d'incompatibilité (locus S identiques), il y a une inhibition du développement du tube pollinique par déshydratation du grain de pollen suite à la fermeture des aquaporines, bloquant ainsi sa germination.

KAPP, quant à lui, est un régulateur négatif de SRK. KAPP déphosphoryle SRK et régule donc négativement le complexe SRK activé (Kachroo *et al.*, 2002 ; Tichtinsky, 2003).

B.2.2.2. L'élongation et la croissance cellulaire médiées par le récepteur BRI1

Le gène *BRI1* (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) chez *Arabidopsis thaliana* a été mis en évidence suite à des criblages génétiques réalisés chez des mutants *bri1* insensibles à l'application exogène de brassinostéroïdes, des hormones stéroïdiennes végétales impliquées dans la régulation de la croissance par élongation cellulaire. Une mutation au niveau de ce récepteur se manifeste par un phénotype nain.

Le gène *BRI1* code pour un récepteur (Fig.8) RLK-LRR, un récepteur à Ser/Thr kinase dont le domaine extracellulaire est constitué de 25 LRRs (Leucine rich repeats) dans lesquels un îlot de 70 acides aminés répétés (intercalé entre les LRRs 21 et 22) est critique pour le fonctionnement biologique du récepteur (Becraft, 2002 ; Clouse *et al.*, 2002).

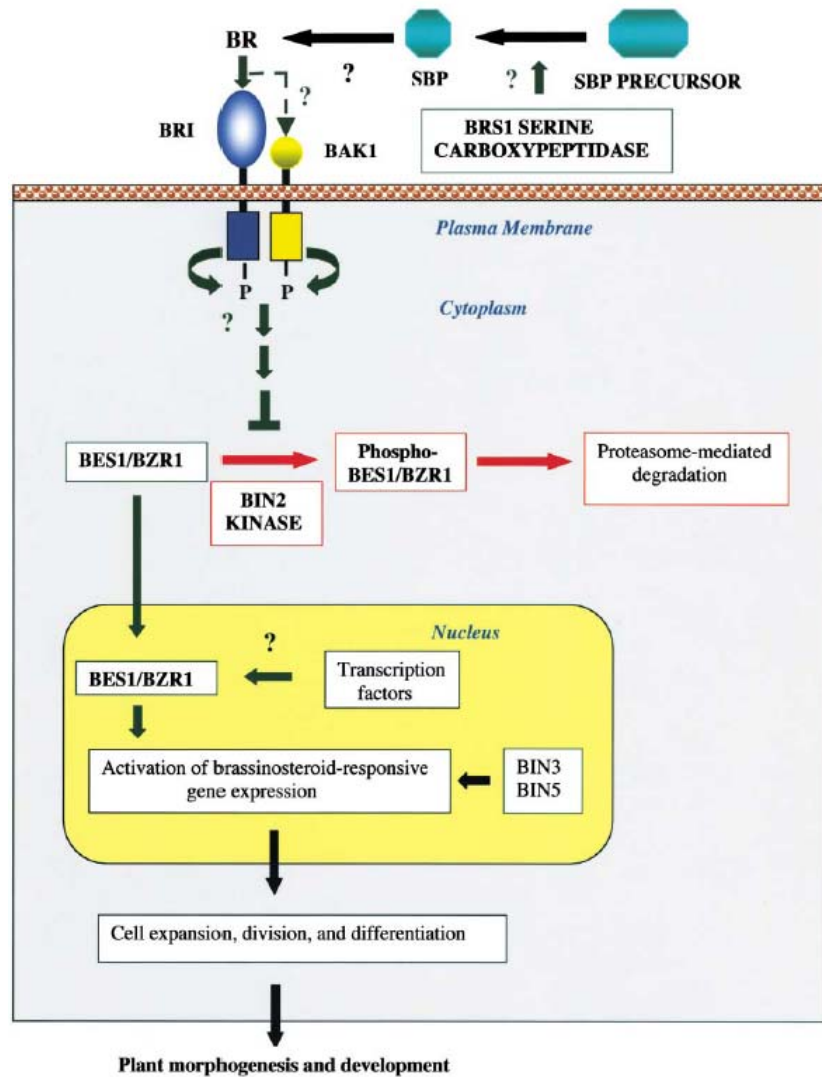


Fig.11: Modélisation de la voie de transduction du signal initiée par le récepteur BRI1. La liaison d'un brassinoséroïde induit l'hétérodimérisation de BRI1 avec BAK1 (BRI1-associated receptor kinase). Le complexe BRI1/BAK1, après autophosphorylation, inactive ensuite BIN2 (BR-insensitive2 kinase) via un ou plusieurs intermédiaires non identifiés. Une fois BIN2 inactivé, BES2 (BRI-EMS-suppressor) et BZR1 (Brassinazole-resistant1), deux facteurs de transcription ne sont plus dégradés et migrent vers le noyau pour y activer des gènes de réponses aux brassinostéroïdes. En absence de brassinostéroïde, BZR1 et BES2 sont phosphorylés par BIN2 et dégradés par le protéasome (Clouse *et al.*, 2002).

Les domaines LRRs sont composés d'environ 23-25 répétitions du motif L- - L- - L- - L- - L- - N—L—G—I P- -. Ils contiennent également deux paires de cystéines conservées probablement impliquées dans la dimérisation du récepteur via des ponts disulfures (Torii *et al.*, 2000 ; Diévert *et al.*, 2003).

D'un point de vue structural, le domaine LRR est constitué d'une succession de plans β reliés par une boucle à une hélice α parallèle au plan β (Fig.10). Cette alternance permet l'adoption d'une conformation non globulaire spécialisée dans les interactions protéine-protéine (Diévert *et al.*, 2003).

Les domaines LRRs, existant également chez les animaux et les bactéries, peuvent être subdivisés en sept familles selon leur motif consensus et le nombre de répétitions de leucines. Seule une de ces familles est spécifique des plantes. (Torii *et al.*, 2000 ; Diévert *et al.*, 2003). Parmi les 610 RLKs d'*Arabidopsis thaliana*, 216 sont des RLK-LRR.

La voie de transduction du signal de BRI1 (Fig.11) est contrôlée par la protéine BRS1 (BRI1 suppressor dominant) qui clive, afin de la rendre compétente, la protéine liant le stéroïde (SBP). De ce fait, la partie extracellulaire de BRI1 peut interagir avec le complexe SBP-BR (brassinostéroïde) (Li *et al.*, 2001 ; Tichtinsky, 2003). BRI1 interagit ensuite avec un second récepteur LRR nommé BAK1 (BRI1-associated receptor kinase 1), possédant une structure moléculaire semblable à celle de BRI1 (Nam *et al.*, 2002), mais ne possédant que 5 répétitions LRRs et étant dépourvu de l'îlot de 70 acides aminés mentionné précédemment. Les activités kinases de BRI1 et de BAK1 sont requises pour déclencher la cascade de phosphorylation. Deux schémas d'action sont proposés par, respectivement, Nam (2002) et Li (2002). Le premier prétend qu'un déséquilibre entre les monomères inactifs BRI1/BAK1 et l'hétérodimère BRI1-BAK1 actif stabilisé par la liaison de BR favoriserait la transphosphorylation du domaine cytosolique de chaque partenaire et mènerait à l'activation des kinases en aval. Le second auteur propose que BR se lierait à BRI1, qui lui-même activerait BAK1 par transphosphorylation. BAK1-P phosphorylerait ensuite divers composés en aval. Aucun substrat direct de BRI1 n'a encore été identifié à l'heure actuelle. Plus loin dans la cascade signalétique, la protéine kinase BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2) est considérée comme un régulateur négatif de la voie de transduction BR (Perez-Perez *et al.*, 2002). BIN2 phosphoryle BZR1 (brassinazole resistant 1) et BES1 (bri1-EMS- suppressor1), deux protéines contenant des séquences NLS bipartites et de multiples sites de phosphorylation.

En absence de BR, BIN2 phosphoryle BES2 et BZR1 qui seront dégradés par le protéasome et ne pourront pas exercer leur rôle dans le noyau de la cellule. En présence de BR, BZR1 et BES1 ne sont plus phosphorylés par BIN2, ne sont plus dirigés vers le protéasome, et peuvent donc s'accumuler dans le noyau (He *et al.*, 2000) où ils modifient l'expression de certains gènes impliqués dans l'élongation cellulaire, la différenciation vasculaire, la division cellulaire, l'optimisation de l'adaptation environnementale, la synthèse de phytohormones (Bishop et Koncz, 2002 ; Becraft *et al.*, 2002). L'expression de gènes impliqués dans la division (*CycD3*, cycline spécifique de cette voie), l'élongation cellulaire (*TCH4*, xyloglucane endoglycosyltransférase) ou encore la répression de gènes (comme *BRH1* codant pour un facteur de transcription) sont la conséquence de la transduction du signal déclenchée par la liaison BR-BRI1 (Molnar *et al.*, 2002). Yin (2002) a également identifié deux autres intermédiaires de la voie de BRI1, BIN3 et BIN5, comme des sous-unités d'une topoisomérase potentiellement impliquée dans la réponse BR (Clouse *et al.*, 1996 et 2002 ; Hu *et al.*, 2000 ; Becraft, 2002 ; Yin *et al.*, 2002 ; Molnar *et al.*, 2002).

B.2.2.3. Récepteurs impliqués dans l'organogenèse et la morphogenèse : CLAVATA

CLAVATA (*CLV*), composé de trois loci au sein du génome d'*A.thaliana*, intervient dans l'organogenèse, ou plus exactement dans le contrôle de la prolifération cellulaire au niveau du méristème apical. Une mutation *clv* cause typiquement un élargissement du méristème et une augmentation du nombre d'organes floraux et de verticilles (Torii *et al.*, 2000 ; Tichtinsky *et al.*, 2003).

Le récepteur CLAVATA est composé de deux protéines : CLV1 et CLV2. CLV1 (Fig.8) est un récepteur Ser/Thr kinase complet constitué d'un ectodomaine contenant 23 LRRs délimité par deux paires de cystéines, l'une au début et l'autre à la fin des LRRs. Ces cystéines pourraient être des motifs de dimérisation du récepteur (Torii *et al.*, 2000). CLV2 est un récepteur tronqué dépourvu du domaine kinase. CLV1 et CLV2 forment un hétérodimère grâce à la formation d'un pont disulfure. CLV3 est le ligand du récepteur CLAVATA et est sécrété par certaines cellules méristématiques. (Lease *et al.*, 1998 ; Haecker *et al.*, 2001 ; Becraft, 2002, Yin *et al.*, 2002 ; Lindsey *et al.*, 2002 ; Tichtinsky *et al.*, 2003).

En présence de CLV3, le complexe CLV1/CLV2 dimérise. De cette dimérisation résulte la transphosphorylation du récepteur puis la phosphorylation de la phosphatase KAPP, un régulateur négatif de la cascade transductionnelle (Fig.12) initiée par CLV1. Une sur-

expression de KAPP se traduit par une augmentation du nombre de carpelles par fleur, phénotype similaire aux mutants *clv1*. Une petite protéine liant le GTP, Rop (Rho-GTPase-related protein), agit directement ou indirectement en aval du complexe CLV1-CLV2. Elle serait responsable de l'activation d'une cascade de MAP kinases menant à la répression de l'expression de WUSCHEL (*WUS*), un gène homéotique contrôlant le devenir des cellules souches du méristème. POLTERGEIST (*POL*) fonctionne comme un régulateur négatif de cette signalisation cellulaire (Lease *et al.*, 1998 ; Haecker *et al.*, 2001 ; Becraft, 2002 ; Lindsey *et al.*, 2002 ; Tichtinsky, 2003). Une boucle de rétroaction entre les activités CLV3 et WUS (Becraft, 2002) impliquant les trois couches méristématiques L1, 2 et 3 a été mise en évidence. L'activité WUSCHEL des cellules centrales de L3 contrôle, à la fois, le nombre de cellules souches et active la transcription de *CLV3* dans les cellules L1. Le rapport entre l'activité de *WUS* et la production de *CLV3* constitue le facteur prépondérant dans le contrôle du nombre de cellules souches au sein du méristème (Lease *et al.*, 1998 ; Haecker *et al.*, 2001 ; Lindsey *et al.*, 2002 ; Becraft, 2002 ; Tichtinsky *et al.*, 2003).

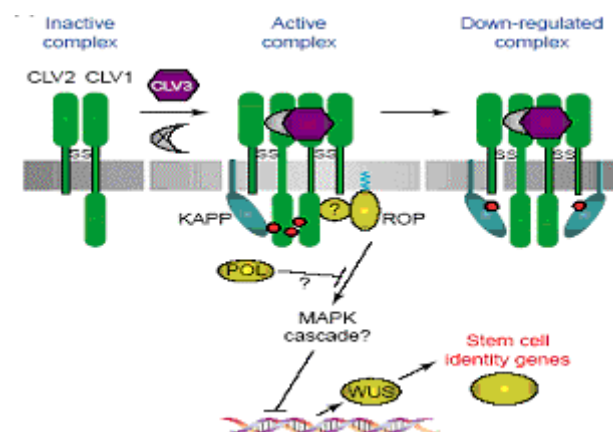


Fig.12: Modélisation de la voie de transduction du signal initiée par le récepteur CLAVATA (CLV) selon Tichtinsky (2003). En présence de CLV3, deux complexes inactifs CLV1-CLV2 dimérisent. Suite à la dimérisation, l'hétérocomplexe formé recrute les protéines Rop (Rho-GTPase-like protein) et KAPP (Kinase-associated protein phosphatase). Cette dernière est ensuite phosphorylée. La conséquence de cette phosphorylation est l'activation de la voie des MAP kinases via la protéine Rop. L'aboutissement de la cascade de transduction du signal est la répression de la transcription du gène WUS (WUSCHEL) qui contrôle le nombre de cellules souches dans le méristème apical.

B.2.2.4. Récepteurs impliqués dans la défense contre les pathogènes

Ces récepteurs sont grossièrement subdivisés en deux classes. La première contient ceux reconnaissant les déterminants pathogènes/virulents (Avr) agissant comme éliciteurs et étant spécifiques, uniques à chaque pathogène. A chaque gène d'avirulence (Avr) du pathogène correspond un gène « R » de résistance chez le végétal (interaction dite « gène pour gène »). Dans ce cas, il y a eu adaptation du pathogène pour l'environnement unique que constitue l'intérieur de l'hôte.

La seconde classe de récepteurs intervenant dans la défense contre les pathogènes comprend les récepteurs reconnaissant des structures pathogéniques équivalentes physiologiques des PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns). Les effecteurs du pathogène reconnus par les récepteurs de la plante sont essentiels pour le fonctionnement/ la survie du pathogène et sont donc conservés (Nürnberger et Scheel, 2001; McDowell et Woffenden, 2003 ; Gomez-Gomez, 2004).

- B.2.2.4.1. Un exemple de récepteur généraliste : FLS2

Assez récemment ont été découverts les gènes *FLS1* et *2* (FLAGELLIN SENSING 1-2) intervenant dans le cadre de la reconnaissance des flagelles bactériens (bactéries gram-), et donc de la résistance et de la réponse aux pathogènes. FLS2 est un récepteur contenant un domaine extracellulaire LRR et un domaine intracellulaire Ser/Thr kinase. FLS2 est structuellement similaire aux domaines Toll et TLRs (Toll like receptor) respectivement de la drosophile et des mammifères. Au vu de la similarité entre ces systèmes de transduction du signal, une origine évolutive commune des réponses immunes innées entre végétaux et animaux est envisageable (Torii *et al.*, 2000 ; Cock *et al.*, 2002 ; Montesano *et al.*, 2003 ; Tichtinsky *et al.*, 2003).

FLS2 reconnaît un domaine conservé de 15 acides aminés de la flagelline eubactérienne, protéine fortement antigénique (antigène H) d'une des trois parties du flagelle. (Gomez-Gomez 2001 ; Yin *et al.*, 2002). En conséquence de la liaison de la flagelline (Fig.13) sur FLS2, le récepteur dimérise, s'autophosphoryle et initie également une voie de transduction du signal type MAP Kinase menant à l'activation de gènes de défense. La phosphatase KAPP serait un régulateur négatif de l'activité de FLS2 (Torii *et al.*, 2000 ; Cock *et al.*, 2002 ; Montesano *et al.*, 2003 ; Tichtinsky *et al.*, 2003).

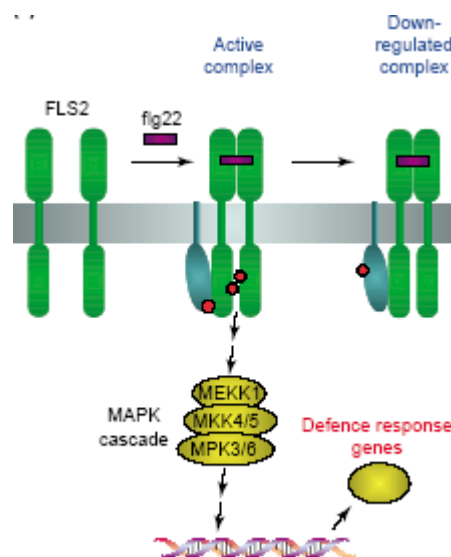


Fig.13: Représentation schématique de la voie de transduction du signal par activation du récepteur FLS2 (Flagellin sensing2) liant la flagelline. Suite à la liaison de la flagelline via le peptide flg22, le récepteur FLS 2 dimérise et active une voie de MAP Kinase menant à l'activation de gènes de défense. La protéine KAPP (Kinase-associated protein phosphatase) est un régulateur négatif de cette voie de transduction du signal (Tichtinsky, 2003).

- B.2.2.4.2. Un exemple de récepteur spécialiste : Xa21

Xa21 est un récepteur Ser/Thr kinase avec un domaine extracellulaire à répétitions riches en leucines (Fig.8). Les récepteurs Xa21 appartiennent à une famille de récepteurs kinases conférant chez le riz la résistance à *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*.

La reconnaissance du pathogène se ferait au niveau du domaine LRR. Suite à la liaison du ligand, une dimérisation du récepteur permet l'activation du domaine kinase intracellulaire. Celle-ci déclenche une cascade de phosphorylation

aboutissant à une restriction de la croissance du pathogène. (Song *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1998).

Les gènes codant pour les récepteurs Xa21 font partie d'une famille multigénique localisée au niveau du chromosome 1. Des différences en acides aminés au sein des répétitions LRR de Xa21 suggèrent que les membres de cette famille de récepteurs auraient pu évoluer pour reconnaître différents pathogènes (Song *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1998 ; Torii *et al.*, 2000 ; Tichtinsky *et al.*, 2003).

B.2.2.5. Récepteurs à domaines type-lectines

Une lectine peut être définie comme une protéine autre qu'immunoglobuline avec au moins un domaine non-catalytique de liaison de carbohydrates. Suite au séquençage du génome d'*A.thaliana* 42 LecRK (récepteurs kinases à domaines lectines) ont été répertoriés et subdivisés en 3 classes (A-C), ainsi que plusieurs lectines solubles.

Les récepteurs kinases type-lectines (LecRKs) ont une structure similaire aux autres RLKs : un domaine extracellulaire de type lectine, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire Ser/Thr kinase. Les récepteurs LecRKs fixent des sucres complexes mais sont incapables de fixer des monosaccharides. Cependant, étant donné la faible conservation des résidus impliqués dans la liaison de sucres, les LecRKs pourraient également être impliqués dans la reconnaissance d'hormones hydrophobes ou encore de glycans plus complexes.

Excepté le cas de LecRK1, la fonction physiologique de cette classe de récepteur n'a toujours pas été élucidée. La fonction biologique de LecRK1 serait de fixer des oligosaccharides exogènes et/ou endogènes issus de la dégradation de la paroi suite à une attaque pathogène et d'initier une réponse de défense. La fonction physiologique de cette classe de récepteurs chez la plante est encore mal définie. Assez curieusement, la transcription du gène LecRK est induite par les OGAs (Hervé *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1997 ; McCarthy et Chory, 2000 ; Torii *et al.* 2000 ; Hardie, 2000 ; Loris, 2002 ; Becraft 2002 ; Navarro-Gochicoa *et al.*, 2003).

Nous avons vu que la paroi cellulaire joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité cellulaire et constitue également une source d'informations pour la croissance, la différenciation et la défense du protoplaste. Faisant face à cette matrice extracellulaire particulière, la cellule végétale dispose d'un arsenal de récepteurs potentiels dont certains ont été décrits dans les paragraphes précédents. Dans le chapitre suivant, nous allons aborder la problématique du lien physique et signalétique entre la matrice extracellulaire et la cellule végétale. Une attention particulière y sera accordée aux récepteurs WAKs.

C. Molécules intervenant dans le pontage paroi cellulaire – membrane plasmique

La principale différence structurale entre les cellules végétales et animales est la présence d'une matrice extracellulaire (MEC) rigide (la paroi cellulaire) chez les premières.

C.1. Protéines assurant un lien entre la MEC et le cytoplasme chez les cellules animales

Les principales protéines d'adhésion chez les cellules animales sont, les intégrines, les protéoglycans et les protéines de la matrice comme les fibronectines (Fn) et les vitronectines (Vn).

Les intégrines (Fig.14) constituent une famille multigénique de récepteurs glycoprotéiques transmembranaires composés de deux sous-unités α et β . Malgré l'existence de 15 sous-unités α et de 8 sous-unités β , et donc d'un nombre élevé de combinaisons potentielles entre ces différentes sous-unités, seulement 21 intégrines ont été répertoriées chez les animaux. En effet, certaines sous-unités α ne peuvent interagir qu'avec une seule sous-unité β (Hynes, 1992 ; Schwartz, 1992 ; Clark *et al.*, 2001).

Fig.14: Schématisation d'une intégrine animale constituée des sous-unités α et β . L'oligomérisation entre ces domaines permet la création de domaines de liaison pour des ligands intra- et extra-cellulaires, à savoir respectivement, la taline ou l'alpha-actinine et la fibronectine, la vitronectine, le collagène ou encore des motifs RGD présents dans d'autres protéines d'adhésion de la matrice extracellulaire des cellules animales.

Les intégrines sont attachées à la matrice extracellulaire par leur extrémité N-terminale via des protéines telles que la vitronectine, la fibronectine, le collagène, la laminine et d'autres protéines possédant un motif RGD (arginine/glycine/acide aspartique). Elles sont également connectées, du côté intracellulaire, aux filaments intermédiaires ou aux filaments d'actine grâce à des protéines telles que la taline, la vinculine et l' α -actinine. Quand les intégrines se lient à la MEC, elles se regroupent et s'associent avec un complexe promouvant l'assemblage des filaments d'actine. La réorganisation de ces filaments d'actine en fibres plus larges favorise un rassemblement plus intense des intégrines (boucle de rétroaction positive) (Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Clark, 2001).

Les intégrines assurent la transmission du signal bidirectionnellement chez tous les eucaryotes multicellulaires, à l'exception des plantes et des champignons (Baluska, 2003). En effet, l'adhésion intercellulaire peut être régulée via une altération du répertoire potentiel de domaines extracellulaires exprimés à la surface cellulaire où l'affinité des intégrines pour leur ligand serait réversible, saturable et caractérisée par une relativement bonne affinité (=inside-out signaling) (Canut *et al.*, 1998). Une interaction de cellules avec la MEC peut engendrer une régulation des processus cellulaires fondamentaux incluant la survie, la différenciation, la prolifération, la migration ou encore la morphogenèse cellulaire (=outside-in signaling) (Dedhar et Hannigan, 1996 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Clark, 2001).

C.2. Protéines assurant un lien entre la MEC et le cytoplasme chez les cellules végétales

De par l'importance des intégrines dans la signalisation entre la matrice extracellulaire et la cellule animale, la présence de telles protéines chez les végétaux ne faisait *a priori* aucun doute. Des anticorps anti-structure tridimensionnelle d'une intégrine animale fortement conservée (Laval *et al.*, 1999), ou des anticorps polyclonaux dirigés contre des intégrines humaines ont permis de détecter des protéines présentant une homologie « immunologique » avec les intégrines animales (Faik *et al.*, 1998 ; Clark, 2001). Cependant, ces résultats ont été contestés : le génome d'*Arabidopsis thaliana* ne contient pas de gènes codant pour des intégrines ou pour des protéines associées à l'actine telle que la taline,... (Clark, 2001). De même, la présence de protéine type-vitronectine chez la cellule végétale fut également mise en doute suite à la découverte par détection immunologique d'une réaction croisée entre la protéine type-vitronectine et EF-1 α (facteur d'élongation; Yang *et al.* 1990 ; Zhu *et al.*, 1994).

Wyatt et Carpita (1993) ont pourtant découvert une protéine pariétale de 48 kDa nommée FnBP (Fibronectin Binding Protein) chez l'oignon liant spécifiquement la fibronectine humaine. FnBP se lie spécifiquement à Fn, à la taline ou à l'actine. Selon Wyatt et Carpita (1993), FnBP se lierait à une seconde protéine, toujours non identifiée, liant à son tour les polysaccharides pectiques de la matrice extracellulaire (Miller *et al.*, 1997).

Vu l'absence de séquences codant pour des composés pontant la membrane plasmique, la matrice extracellulaire et le cytosquelette identiques à celles trouvées chez les animaux (He *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1997 ; Ridley *et al.*, 2001), il faut conclure que des alternatives spécifiques ont été développées au cours de l'évolution par les végétaux. L'organisation particulière des sites d'adhésion et de signalisation chez les plantes pourrait être la conséquence de la nature tout aussi particulière de leur paroi cellulaire.

Kohorn (2000) et Baluška (2003) ont proposé qu'au moins cinq types de protéines pourraient être impliquées dans le pontage entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique chez les plantes: les protéines arabinogalactanes ou AGPs, les celluloses synthases, les endo-1,4- β -D-glucanases ou EGases (Brummel *et al.*, 1997 ; Nicol *et al.*, 1998), les formines (Deeks, 2002) et les kinases associées à la paroi ou WAKs (Wall-associated kinases). Parmi

celles-ci, les AGPs, les cellulose-synthases et les WAKs pourraient également avoir une fonction signalétique.

C.2.1. Les cellulose-synthases

Les cellulose-synthases sont des protéines transmembranaires en forme de rosette, associées à des sucrose-synthases (Susy) du côté cytoplasmique (Pear *et al.*; 1996) et synthétisant la cellulose. L'association de la rosette avec Susy permet, via un UDP-glucose, le transfert de glucose du sucrose vers la chaîne cellulosique en croissance.

Lorsque les cellulose-synthases sont reliées à Susy, elles permettent d'établir une liaison entre le métabolisme intracellulaire du carbone et la mise en place d'une architecture pariétale particulière via, entre autres, leur interaction avec le cytosquelette (Wiedemeier *et al.*, 2002). Ces structures pariétales pourraient alors à leur tour informer la cellule et modifier les dépôts ultérieurs de « paroi »

C.2.2. Les AGPs

Les AGPs constituent une famille de protéoglycans de structure complexe capables de lier la pectine et sont présents à la surface cellulaire des bryophytes aux angiospermes (Showalter, 1993; Cosgrove, 1997; Nothnagel, 1997).

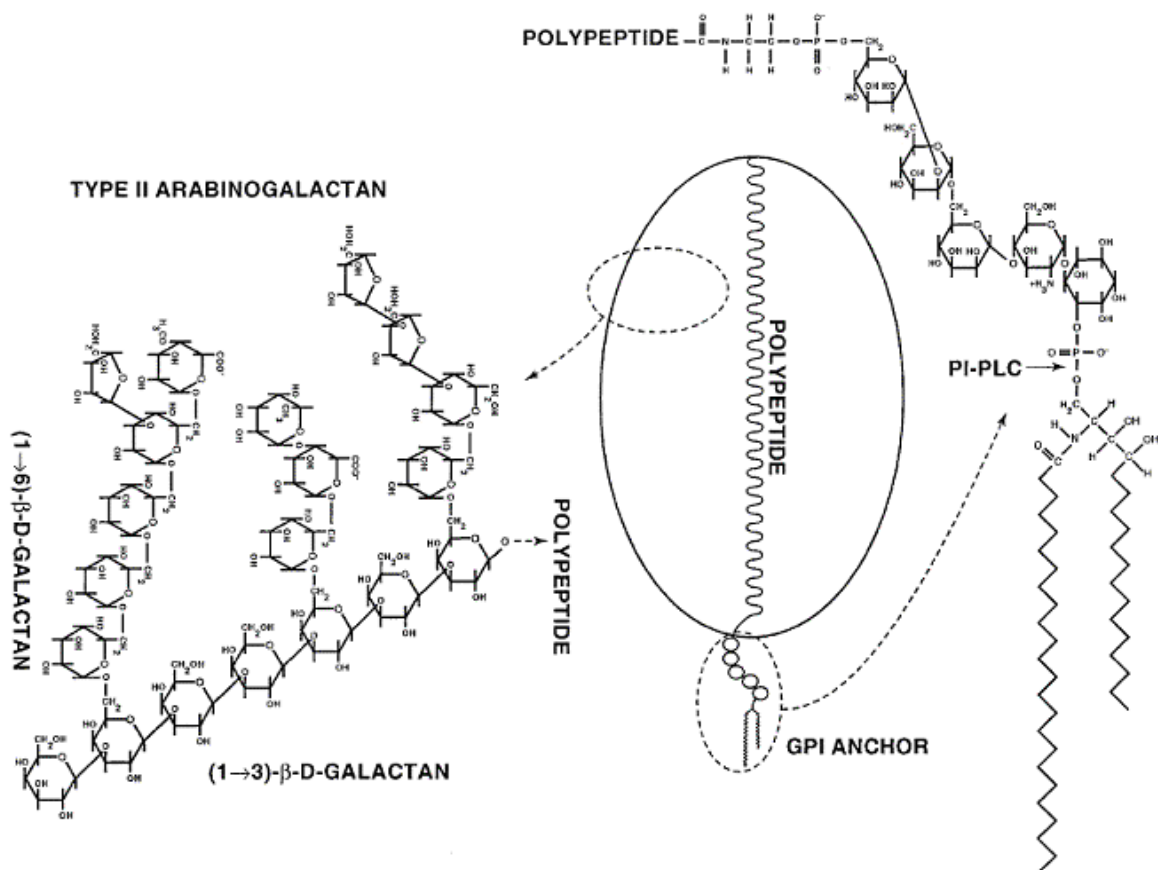


Fig.15: Représentation d'une AGP avec l'ancre glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) carboxy-terminal. Les AGPs sont constituées d'une armature protéique sur laquelle sont greffées des chaînes polysaccharidiques composées de β-(1-3)-galactoses avec des chaînes latérales de β-(1-6)-galactoses terminées par des arabinoses.

Les AGPs (Fig.15) contiennent un noyau protéique riche en hydroxyprolines (10%) et des groupes latéraux polysaccharidiques (90%) comprenant de longues chaînes de β -(1-3)-galactanes avec des chaînes latérales de β -(1-6)-galactose terminées par des arabinoses. Selon la composition de leur squelette protéique, on distingue habituellement les AGPs dits « classiques » et « non classiques » (Bacic *et al.*, 1996 ; Du *et al.*, 1996). Les AGPs classiques sont pourvus d'un signal de sécrétion amino-terminal, d'une région centrale riche en proline/hydroxyproline-, alanine-, sérine-, et thréonine de longueur variable et d'une courte région hydrophobe carboxy-terminale. Les AGPs non-classiques ne partagent pas de domaines structuraux identiques entre eux mais ont un signal de sécrétion N-terminal, une région riche en proline/hydroxyproline-, alanine-, sérine-, thréonine-, et une région C-terminale variable mais hydrophile auquel sont attachées de longues chaînes de galactose avec des groupes latéraux d'arabinoses (Bacic *et al.*, 1996 ; Du *et al.*, 1996).

La forte glycosylation des AGPs a lieu dans le système endomembranaire où peut leur être ajouté une ancre glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) carboxy-terminale (Fig.15). Celle-ci remplacerait même la région hydrophobe C-terminale, du moins chez les AGPs classiques de *Nicotiana glauca*, *Pyrus communis* et *Rosa sp* (Svetek *et al.*, 1999). Selon Svetek *et al.* (1999), l'ancre GPI permet l'ancrage en membrane de la protéine (et donc potentiellement le maintien du contact avec la paroi) plutôt que sa sécrétion dans la paroi. Cette position privilégiée confère aux AGPs une implication potentielle dans la transduction du signal entre la matrice extracellulaire et la cellule végétale (Oxley et Bacic, 1999 ; Svetek *et al.*, 1999 ; Majewska-Sawka et Nothnagel, 2000 ; Borner *et al.*, 2002 ; Shi *et al.*, 2003).

Vu l'expression tissu spécifique des AGPs, il a été postulé qu'elles pourraient jouer un rôle prépondérant dans la croissance et le développement de la plante, la prolifération et l'expansion cellulaire ainsi que dans l'embryogenèse somatique, la croissance du tube pollinique ou encore la mort cellulaire (Serpe *et al.*, 1994 ; Willats *et al.*, 1996 ; Ding *et al.*, 1997 ; Langan *et al.*, 1997)

C.2.3. Les WAKs ou kinases associées à la paroi

C.2.3.1. Introduction

Les WAKs apparaissent comme les meilleurs candidats pour effectuer un pontage signalétique entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique.

Malheureusement, les protéines WAKs font encore à l'heure actuelle partie de la grande famille des récepteurs doublement orphelins, c'est-à-dire dont ni le ligand ni la cascade de transduction du signal qu'ils contrôlent ne sont connus.

Les premiers WAKs décrits chez *Arabidopsis thaliana* sont au nombre de cinq (WAK 1-5) et sont regroupés en une zone de 30 kb sur le chromosome 1 (He *et al.*, 1996 ; He *et al.*, 1999). Cette famille de récepteurs a été agrandie avec la découverte de 21 nouveaux gènes dits *WAK-like* (WAKL) répartis, eux, sur l'entièreté des cinq chromosomes d'*A.thaliana* (Verica et He, 2002).

Les gènes *WAK 1-5* encodent des récepteurs type Ser/Thr kinases transmembranaires. Le domaine kinase intracellulaire est très bien conservé (86%) entre les diverses isoformes. Le domaine extracellulaire est lui relativement mal conservé (40-64%) et confère probablement une spécificité à chaque isoforme WAK. La présence de deux répétitions type-EGF, (EGF-Ca et EGF₂) à proximité du domaine transmembranaire constitue cependant une caractéristique commune aux domaines extracellulaires de WAK 1-5 (Anderson *et al.*, 2001 ; Cosgrove 2001 ; Lally *et al.*, 2001). Les domaines EGF contiennent chacun six cystéines conservées, mais la séquence en acides aminés entre ces cystéines varie (Kohorn, 2001).

Les protéines WAKs possèdent également, selon les isoformes, plusieurs sous-domaines extracellulaires partiellement homologues à des protéines de la matrice extracellulaire des

cellules de mammifères telles que le collagène, la neurexine ou encore la tenascine (Fig.16). Aucun rôle de ces sous-domaines dans le fonctionnement du récepteur kinase n'a été mis en évidence jusqu'à présent (Miller *et al.*, 1997 ; He *et al.*, 1999 ; Wagner *et al.*, 2001 ; Lally *et al.*, 2001 ; Verica et He, 2002 ; Becraft, 2002).

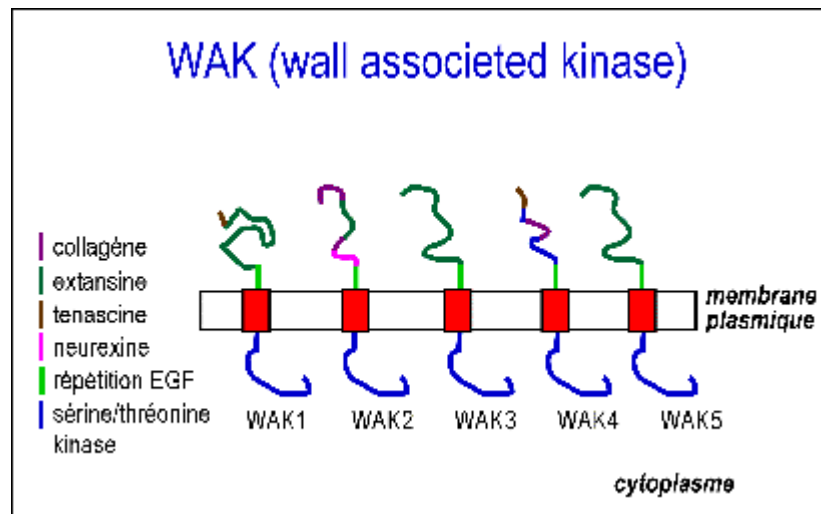


Fig.16: Représentation schématique des récepteurs transmembranaires WAK 1-5. Les domaines Ser/Thr kinases intracellulaires sont bien conservés (84%) au sein des 5 isoformes WAKs. Les domaines extracellulaires présentent une homologie avec des domaines protéiques typiquement animaux (extensine, collagène tenascine, neurexine) et sont, à l'exception des répétitions EGFs, mal conservés (46-64%) entre les isoformes WAKs.

C.2.3.2.Expression des WAKs

Grâce à des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* transformées avec le gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) sous le contrôle du promoteur de *WAK1-5*, le niveau d'expression et la localisation de chaque isoforme ont été déterminés.

Wak1 et 2, les deux isoformes les plus abondamment exprimées, et de la façon la plus ubiquiste, sont actifs au niveau des tissus vasculaires de la feuille et du pétiole. Leur activité au niveau du méristème apical, des tiges et racines, de la jonction des organes, et au niveau floral est également intense. Le promoteur *wak1* est actif au niveau des siliques. A un stade de développement assez avancé, l'activité GUS passe de la pointe de la silique à l'ensemble des tissus. *Wak1* s'exprime également au niveau des sépales et du stigmate tandis que *wak2* est actif à la base des fleurs. *Wak1* et *Wak2* peuvent être actifs au même moment dans un même organe mais à un endroit différent. C'est le cas, par exemple, des cotylédons âgés de trois jours où *Wak1* est préférentiellement exprimé au niveau des tissus vasculaires, alors que *Wak2* l'est dans le reste du cotylédon (He *et al.*, 1999 ; Wagner et Kohorn, 2001). Le promoteur *Wak3* s'exprime uniquement au niveau du pétiole (Wagner *et al.*, 2001). Etant donné que la protéine WAK3 s'accumule au niveau des sites de micro-lésions induites par des pathogènes, *wak3* pourrait jouer un rôle dans les infections pathogéniques du végétal (He *et al.*, 1999 ; Wagner *et al.*, 2001). *Wak4* et 5 sont exclusivement exprimés respectivement dans les siliques et organes verts.

L'expression des gènes WAKs est donc fonction de facteurs environnementaux biotiques et/ou abiotiques et du stade de développement (He *et al.*, 1999 ; Wagner *et al.*, 2001 ; Kohorn, 2001). Les expressions des différentes isoformes de WAKs se recouvrant assez fortement, l'idée d'une interaction physique et/ou physiologique entre ces dernières a été envisagée. En d'autres mots, étant donné que les WAKs sont exprimés dans les mêmes et/ou différents types cellulaires, l'existence d'une cascade de transduction du signal impliquant des homo - et hétérodimères a été suggérée (He *et al.*, 1999 ; Wagner *et al.*, 2001 ; Anderson *et al.*, 2001).

C.2.3.3. Interaction WAK – paroi

- C.2.3.3.1. Interaction avec une protéine riche en glycines (GRP)

Les GRPs sont des protéines découvertes dans la paroi mais qui, en fait, sont localisées à de multiples endroits et ont de multiples fonctions. La seule caractéristique commune à toutes les GRPs est la présence de domaines riches en glycines : GGGX, GXGX, ou GGXXXGG. La région riche en glycines de ces protéines permettrait l'adoption d'une conformation adéquate et/ou la réalisation d'interactions protéine-protéine. Les GRPs sont divisées en deux classes suivant leur capacité à lier une séquence consensus d'ARN ou, dans la majorité des cas, la présence d'un peptide signal les adressant au réticulum endoplasmique.

Il a été précisé par double hybride que WAK1 se lie spécifiquement à AtGRP3, une GRP contenant le motif GGXXXGG, et à aucune autre famille de GRP. Ces expériences ont été confirmées par co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-AtGRP3 suivie d'un Western blot révélé avec des anticorps anti-AtGRP3 et anti-WAK1. L'implication de la phosphatase KAPP dans la formation d'un complexe multimérique a également été avancée grâce à l'utilisation d'anticorps anti-KAPP. Ces résultats ont, à leur tour, été confirmés par chromatographie d'exclusion de taille de fractions protéiques couplée à un Western blot. L'interaction WAK1-AtGRP3 impliquerait les domaines EGF de WAK1 et une région carboxy-terminale riche en cystéines d'AtGRP3 (Park *et al.*, 2001 ; Kohorn, 2001). WAK1 serait indispensable à la formation du lien avec KAPP. Le rôle du complexe WAK1-GRP3-KAPP pourrait être dépendant de la liaison de pectines à WAK1. L'expression d'AtGRP3 se superpose au moins partiellement avec celle de WAK1, ce qui renforce l'idée d'une interaction entre ces deux protéines (Park *et al.*, 2001 ; Sachetto-Martins *et al.*, 2000).

- C.2.3.3.2. Interaction de WAK1 avec la pectine

L'association de WAK1 avec la pectine est forte puisqu'une digestion à la pectinase ou un bain bouillant dans une solution SDS 4% - DTT 50 mM sont indispensables pour solubiliser WAK1 de la paroi cellulaire (He *et al.*, 1996). Ainsi, au vu des conditions de traitement extrêmes nécessaires à la séparation de WAK1 de la paroi cellulaire, une liaison covalente entre WAK et la pectine a été proposée (He *et al.*, 1996 ; Wagner et Kohorn, 2001).

Decreux et Messiaen (2005) ont suggéré que l'interaction WAK – pectine pourrait être non covalente mais ionique. WAK1 se lie à des pectines et des OGAs (de DP supérieure ou égale à 9) adoptant une conformation en « boîte à œufs ». WAK1 n'interagit pas avec des pectines ayant un degré d'estérification compris entre 65 et 90%, suggérant de ce fait une implication des charges négatives dans la liaison WAK – pectine en plus de la structure en « boîte à œufs » (Decreux et Messiaen, 2005).

Un tel type d'interaction non covalente entre WAK1 et la pectine ne serait pas en contradiction avec l'extraction des WAK à la pectinase. Cette dernière dépolymériserait les pectines jusqu'à une DP inférieure à 9, empêcherait la liaison WAK1 – pectine et favoriserait la libération des WAKs. Un tel réarrangement de la structure pectique pariétale durant une attaque par un pathogène, ou simplement durant le recyclage de la paroi, pourrait avoir un sens en terme de signalétique cellulaire au niveau de l'interface paroi cellulaire – plasmalemme et moduler diverses réponses physiologiques induites par des fragments pectiques de DP supérieure ou égale à 9 (Decreux et Messiaen, 2005).

Même si la fonction signalétique de WAK1 n'a toujours pas été démontrée, deux faits expérimentaux attestent l'existence probable de voies de transduction du signal contrôlées par WAK1. La première expérience a démontré par double hybride qu'il y avait liaison entre le domaine extracellulaire de WAK1 et une famille de GRP (AtGRP3). WAK1 et AtGRP3 forment en plus un complexe de 500 kDa *in vivo* avec la phosphatase KAPP. Etant donné, de plus, que SA (acide salicylique) et/ou AtGRP3 induit une augmentation du taux de transcription de *PRI*, *WAK1* et *AtGRP3*, il a été suggéré que les protéines WAK1 et AtGRP-3 à la surface cellulaire interagissent et sont impliquées dans la transduction du signal conduisant à la réponse envers des pathogènes (Park *et al.*, 2001). La seconde expérimentation suggérant l'existence de voies de transduction contrôlées par WAK1 est la phosphorylation de OEE2 (Oxygen-evolving enhancer protein 2 ; protéine chloroplastique) consécutive à la liaison AtGRP3-WAK1. La phosphorylation de OEE2 par WAK1 serait directe, comme le suggère des tests double hybrides en levure et des expériences d'immunoprécipitation. De plus, le complexe AtGRP3/WAK1/OEE2 serait stable (Yang *et al.*, 2003).

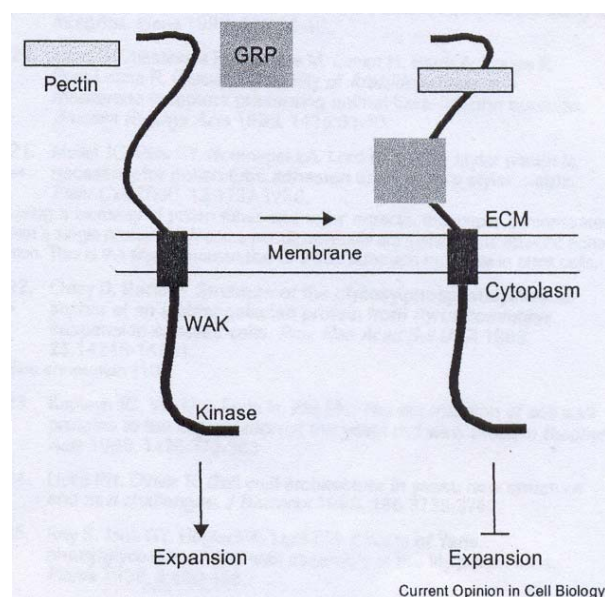
C.2.3.4. Rôles des protéines WAKs

• C.2.3.4.1. WAKs et élongation cellulaire

La paroi cellulaire constitue une structure encadrant le protoplaste, conférant ainsi une forme et une structure à la cellule. La paroi étant fortement rigide, ses éléments constitutifs doivent être partiellement désolidarisés pour permettre l'élongation cellulaire. De par leur localisation et leur association aux pectines, les WAKs seraient de sérieux candidats régulateurs de l'élongation cellulaire. Dans le but de confirmer cette hypothèse, des plantes d'*A.thaliana* ont été transformées avec une construction anti-sens *WAK4* sous contrôle d'un promoteur inducible au dexaméthasone (DEX ; glucocorticoïde synthétique). L'induction de l'expression de l'antisens de *WAK4* se traduit par l'arrêt des activités développementales d'*Arabidopsis thaliana* avec un blocage de l'élongation de l'hypocotyle et des racines, ainsi que de l'extension des feuilles via une diminution de la quantité de certaines extensines connues pour rompre les liens non covalents entre les polysaccharides de la paroi (Lally *et al.*, 2001 ; pour revue: Cosgrove 2001). Des expériences de microscopie électronique à balayage ont confirmé que la petite taille des feuilles de plantes contenant la construction antisens était due à une diminution de taille (et non du nombre) des cellules.

Il est proposé que la liaison d'AtGRP3 et de la pectine au niveau du domaine extracellulaire de WAK (au niveau des EGF-like) se traduirait par une inhibition de l'élongation cellulaire en « fixant » la matrice extracellulaire au plasmalemme (Fig.17) (Kohorn, 2001).

Fig.17: Modèle de la régulation de l'élongation cellulaire par WAK1. Cette schématisation de l'interaction WAK – pectine – GRP montre qu'une liaison entre ces trois éléments permet une inhibition de l'expansion/élongation cellulaire (Kohorn, 2001).



C.2.3.4.2. WAKs et réactions défensives

C.2.3.4.2.1. Stress biotiques

Deux types de réponses permettent au végétal de se défendre : une réponse locale (dite « hypersensible ») et une réponse systémique (dite « résistance acquise systémique »). La réponse hypersensible limite la progression du pathogène au site d'infection. Elle consiste en une mort cellulaire programmée s'étendant dans la région infectée afin de limiter l'expansion du pathogène. Ce type de protection induit la synthèse de protéines PR (pathogenesis related), de phytoalexines et un renforcement de la paroi cellulaire (Montesano *et al.*, 2003).

La réponse systémique acquise confère une résistance à l'échelle de la plante entière. Cette réponse est assimilable à un vaccin « végétal » vu son effet prolongé dans le temps et la réponse plus rapide lors d'une seconde attaque par un pathogène.

Afin de démontrer le rôle des WAKs dans les interactions plante-pathogène, He *et al.* (1998) ont réalisé des transformations d'*A.thaliana* avec quatre constructions sous le contrôle du promoteur PR1 inductible à l'acide salicylique (SA), composé produit suite à une attaque par un pathogène, ou à l'INA (acide 2,6-dichloroisonicotinique), son homologue synthétique. La première était une construction sens et la seconde une antisens. Les troisième et quatrième constructions comprenaient respectivement les domaines extracellulaire et extramembranaire de WAK1, et les domaines intracellulaire (kinase) et transmembranaire de WAK1 (Fig.18). Seules les constructions 1 et 4 conféraient une tolérance à SA ou INA. WAK1, ou du moins son domaine kinase, intervient donc dans la détoxification de SA et non dans la perception de l'agent pathogène (He *et al.*, 1998 ; Haffani *et al.*, 2004).

Etant donné l'induction par SA de l'expression de *WAK1*, *WAK1* peut-être classée dans la famille des protéines PR (Pathogenesis Related). Son expression est de plus régulée positivement durant une résistance acquise systémique (Maleck *et al.*, 2000), par le méthyljasmonate et l'éthylène (Schenk *et al.*, 2000).

Assez curieusement, un traitement à SA, ou INA, favorise également la transcription de *AtGRP3*. Le profil d'expression de ce dernier, ainsi que la localisation des protéines correspondantes, semblent se superposer à ceux de *WAK1* (Park *et al.*, 2001). Le fonctionnement exact de *WAK1* ou du couple *WAK1/AtGRP3* dans le schéma transductionnel associé à la défense de la plante n'est toujours pas élucidé. Il semblerait cependant que l'accumulation de SA, faisant suite à une attaque pathogène, favoriserait l'accumulation de NRP1 (régulateur positif de protéines PR) dépendante des protéines PR1, 2, 5, d'*AtGRP3* et de *WAK1*. Ce dernier effectuerait un rétro-contrôle négatif sur NRP1 permettant de prolonger l'effet protecteur de *WAK1* (Fig.19) (He *et al.*, 1998 ; Park *et al.*, 2001).

C.2.3.4.2.2. Stress abiotiques

Les hautes températures ou les concentrations élevées en sels n'affectent pas l'expression de *WAK1*. Par contre, l'aluminium est un inducteur puissant de l'expression organe-spécifique de *WAK1* et de la localisation tissu-spécifique des protéines *WAK1* (Sivaguru, 2003). Des analyses RT-PCR montrent une expression typiquement « on/off » suggérant une rapide surexpression de *WAK* après une exposition à l'aluminium. Des plantes surexprimant *WAK1* présentent une tolérance accrue à l'aluminium en terme de croissance, ce qui suggère que *WAK1* est un gène intervenant dans la défense envers une toxicité à l'aluminium. De plus, la plupart des

gènes régulés positivement suite au traitement à l'aluminium montrent une forte homologie avec les gènes *PR* induits par les agents pathogènes (Hamel *et al.*, 1998).

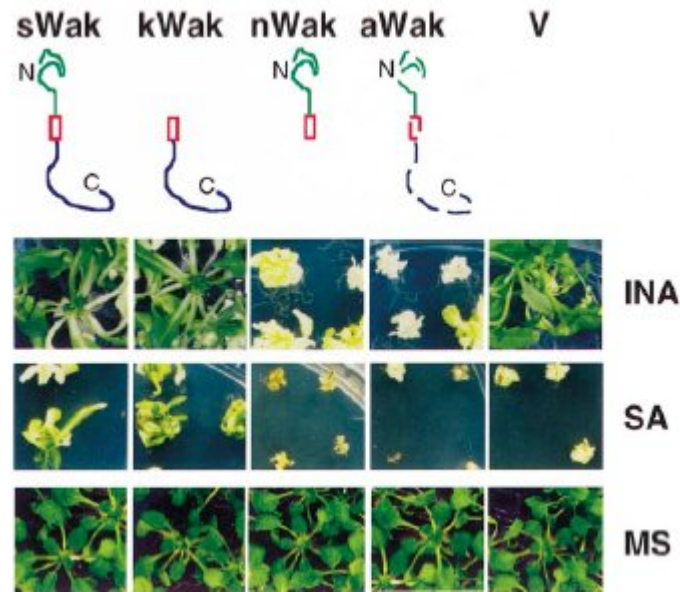


Fig.18: Représentation des différentes constructions utilisées pour la transformation d'*A.thaliana* pour montrer l'implication de WAK dans les interactions hôte/pathogène.

Cette expérience met en évidence un plus faible taux de survie des plantes possédant les constructions aWak et nWak en présence de faibles concentrations en INA (homologue synthétique de SA) par rapport à des plantes n'ayant incorporé que le vecteur vide (V). Les végétaux transformés avec les constructions sWak et kWak sont plus résistants à des concentrations importantes en SA que ceux ne comprenant que V. Le contrôle positif consistait à faire croître des plantes transformées sur un milieu de croissance de base (He *et al.*, 1998).

sWak=Wak complet-construction sens

kWak : encode la partie cytoplasmique de la protéine .

nWak : encode que pour la partie extracellulaire de WAK

aWak : antisens de Wak.

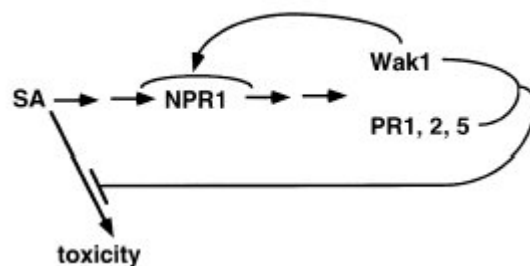


Fig.19: Schéma interactionnel incluant WAK1 dans le cadre d'une réponse contre un pathogène (He *et al.*, 1998). Une attaque par un pathogène, qu'il soit virus, bactérie ou champignon se traduit par la synthèse massive et donc l'accumulation d'acide salicylique (SA) au sein du végétal. SA favorise une activité plus intense de NPR1, régulateur positif requis pour la transcription à haut débit des gènes PR1, 2 et 5 ainsi que WAK1 (ou plus précisément du couple Wak1-AtGRP3). Ce dernier pourrait rétroagir sur NPR1, permettant un entretien de l'effet protecteur.

Objectifs

L'étude sans *a priori* de l'activation d'une voie de transduction du signal par un ligand donné via un récepteur kinase est relativement complexe. Afin de démontrer que ce récepteur déclenche réellement une cascade de phosphorylation, il faudrait détecter par exemple la phosphorylation de sa première cible. Dans le cas qui nous occupe, il s'agit de montrer que la liaison de la pectine au domaine extracellulaire de WAK1 induit, par exemple, la phosphorylation d'une cible de WAK1. Comme nous l'avons vu, la seule cible connue de WAK1 est la protéine chloroplastique OEE2.

Afin de tenter de résoudre la problématique de la signalisation d'un récepteur au travers de la membrane, c'est-à-dire de déterminer si la liaison du ligand au niveau du domaine de perception extracellulaire initie bien une voie de transduction du signal, une alternative consiste à produire un récepteur hybride. Un tel récepteur est constitué des domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire du récepteur à étudier (WAK1 dans notre cas) et du domaine intracellulaire kinase d'un récepteur dont des cibles spécifiques intracellulaires sont connues (BRI1 dans notre cas). L'activation du récepteur hybride par la pectine via le domaine extracellulaire de WAK1 devrait se traduire par l'activation de cibles BRI1.

Le premier objectif de ce mémoire est de poursuivre le travail de V. Ransbotyn (2004) sur la construction d'un récepteur hybride comprenant les domaines extracellulaire, transmembranaires et juxtamembranaires de WAK1 et le domaine kinase du récepteur aux brassinostéroïdes BRI1. Cette construction sera dotée d'un tag polyhistidine pour les caractérisation et localisation sub-cellulaires ultérieures.

Des versions mutées de ce récepteur seront également construites afin de disposer d'un récepteur hybride ne pouvant pas fixer la pectine et d'un autre récepteur hybride ne pouvant pas phosphoryler une cible intracellulaire.

Ces différentes constructions seront introduites dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* via transformation par immersion florale médiée par *Agrobacterium tumefaciens*.

Le deuxième objectif de ce mémoire est d'étudier l'interaction de WAK1 avec la pectine durant un cycle de croissance d'une culture en suspension d'*A.thaliana*.

MATERIEL
&
METHODES

A. Cultures végétales

A.1. Cultures en suspension de cellules: d'*Arabidopsis thaliana* écotype *columbia* (A-TL)

Milieu B-5 Gamborg (pour 1l.) :

- Peser 3,2 g de B-5 (minimum organique, Sigma) ainsi que 30 g de sucrose.
- Dissoudre dans 900 ml d'H₂O désionisée.
- Ajouter, 200 µl d'acide naphthalène acétique [stock : 1 mg/ml] et 100 µl de kinétine [stock : 1mg /ml].
- Ajuster le pH à 5,7 avec du NaOH ; porter à volume.
- Autoclaver.

Les cultures en suspension sont repiquées hebdomadairement en diluant 5 ml de culture dans 45 ml de milieu frais stérile dans un erlen de 250 ml. Les cultures sont placées sur un agitateur orbital (120 rpm) à 22°C. La photopériode est de 16 h luminosité/ 8h obscurité.

A.2. Milieux de germination et de culture de plantules d'*A.thaliana*

- Peser 4,302 g/l de sels de Muraschige et Schoog (micro et macroéléments ; Duchefa biochimie) et 30 g/l de sucrose. Dissoudre dans 900 ml d'eau désionisée.
- Porter à pH 5,8 avec du NaOH.
- Ajouter une proportion adéquate de Plant agar (Duchefa Biochimie) : 0,3 % pour le milieu semi-solide ; 0,8 % pour le milieu solide et pas d'agar pour le milieu liquide.
- Porter à volume (1 litre) avec de l'eau désionisée.
- Autoclaver.

A.3. Transformation des fleurs d'*Arabidopsis thaliana*

Obtention de plantules

- Semer des graines stockées à 4°C individuellement en terreau.
- Incuber en conditions humides (sous cellophane) à 24°C le jour et 22°C la nuit avec une photopériode de 18 heures jusqu'à obtention de fleurs.

Transformation proprement dite

- Centrifuger (3300g, centrifugeuse Beckman Coulter Allegra X-22R) à 28°C des cultures liquides d'*A .tumefasciens*.
- Re-suspendre le culot avec une solution de sucrose 5% fraîche jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,8 et ajouter du Tween-20 (Fluka) (0,01%).
- Immerger les fleurs (ou les rosettes) d'*A.thaliana* dans la préparation d'*A.tumefasciens* 2 à 3 secondes sous une légère agitation.
- Recouvrir les plantules d'un papier film afin de les maintenir en conditions de forte humidité pendant 24 h. après la transformation.
- Répéter les événements de transformation tous les 6 jours.
- Arrêter d'arroser les plantes lorsque les siliques deviennent matures.
- Récupérer les graines en ouvrant les siliques.

Germination des graines « transformées » en conditions stériles et traitement pendant 2 jours au froid.

- Placer les graines deux jours à 4°C.
- Stériliser les graines par passages dans l'éthanol 95% (Merck) en eau (1min.), dans l'eau de javel 2,6% (+0,05 % Tween-20 (Fluka)) 5 min., puis laver trois fois à l'eau désionisée stérile.
- Immerger les graines dans le milieu de germination mis sous agitation (agitateur orbital, 120 rpm) à 24°C le jour et 22°C la nuit (photopériode de 16h luminosité/ 8h obscurité).

Récupération et sélection des graines.

- Récupérer les graines germées via le milieu semi-solide et le « couler » sur milieu solide sélectif (Kanamycine, 50 µg/ml).

B. Cultures d'*E.Coli*

B.1. Milieu LB liquide (pour 1 l)

- Peser 10 g de bactotryptone (Remel), 10 g de NaCl et 5 g d'extrait de levure (Remel).
- Pour un milieu solide, ajouter 15 g / l de Bacti Agar (Remel).
- Mettre à pH 7,0 et porter à volume avec de l'eau désionisée.
- Autoclaver.

B.2. Transformation d'*E.Coli* TOP 10F' par choc thermique

- Dégeler sur glace un tube de 50 µl de cellules thermocompétentes (one shot transformation kit, Invitrogen).
- Ajouter 1 µl du produit de ligation directement dans le tube contenant les cellules compétentes et mélanger délicatement.
- Incuber les cellules sur glace pendant 30 minutes.
- Incuber les cellules pendant 30 secondes dans un bain à 42°C, puis replacer les cellules sur glace pendant 2 minutes.
- Ajouter 250 µl de milieu SOC (Bactotryptone (Remel) 2 %, Extrait de levure (Remel) 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucose 20 mM) à température ambiante.
- Placer les cellules sous agitation (225 rpm) à 37°C pendant une heure.
- Etaler 100 µl de cellules sur milieu LB solide contenant les antibiotiques adéquats.
- Sélectionner les transformants par PCR sur colonies après une nuit d'incubation à 37°C.

C. Culture d'*Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404/virG)

C.1. Préparation de cellules électrocompétentes

- Lancer une culture d'*Agrobacterium* dans 200 ml de milieu LB liquide contenant 25 µg/ml streptomycine, 10 µg/ml rifampycine et 20 µg/ml gentamycine. Incuber les bactéries à 28°C sous forte agitation jusqu'à une absorbance à 600 nm comprise entre 0,5 – 1,0.
- Centrifuger les bactéries à 4000 rpm (Centrifugeuse Beckman J2-21) pendant 10 minutes à 4°C. Eliminer le surnageant et reprendre les bactéries dans 100 ml d'eau froide stérile. Recentrifuger comme ci-dessus. Répéter cette opération deux fois.
- Resuspendre le culot dans 4 ml de glycérol 10 % froid.
- Transvaser les bactéries dans un tube Falcon de 15 ml. Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse Beckman Coulter Allegra X-22R). Eliminer le surnageant et resuspendre le culot de bactéries dans 400 µl de glycérol 10 % froid.
- Aliquoter les bactéries par 50 µl et les stocker à – 70°C jusqu'à utilisation (maximum 6 mois).

C.2. Electroporation d'*Agrobacterium tumefaciens*

- Prélever 50 µl de cellules électrocompétentes et les placer dans une cuvette d'électroporation 0,2 mm (Bio-rad).
- Ajouter 1 µg de plasmide PBI-121 contenant l'insert d'intérêt.
- Mélanger et laisser 1 minute sur glace.
- Electroporer les cellules (Electroporateur Biorad ; 25 µF et 2,5 kV, 400 Ohms)
- Ajouter rapidement 1 ml de milieu LB stérile.
- Incuber les cellules à 28°C.
- Etaler les 100 µl de bactéries sur milieu LB agar sélectif (25 µg/ml de streptomycine, 10 µg/ml de rifampicine, 20 µg/ml de gentamycine et 50 µg/ml de kanamycine).
- Sélectionner les transformants par PCR sur colonies après une 2 à 3 jours d'incubation à 30°C.

D. Culture de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) contenant le vecteur pYES2/NT C

Le protocole concernant le vecteur pYES2/NT (Fig.1) inductible au galactose et contenant le gène *URA3* est disponible à l'adresse suivante : http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pyes2ntpyc2nt_man.pdf

Milieu SC-U (milieu minimum sans uracile) (pour 1l) :

- Dissoudre les composés suivants dans 800 ml d'eau désionisée :
 - ❖ 6,7 g de base azotée.
 - ❖ 0,1 g de : adénine, arginine, cystéine, leucine, lysine, thréonine, tryptophane.
 - ❖ 0,05 g de : acide aspartique, histidine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, tyrosine, valine.
- (Ajouter de l'agar pour un milieu solide).
- Autoclaver.
- Ajouter 200 ml de raffinose 10% filtré stérilement pour un milieu de culture ou 100 ml de glucose 20 % et 100 ml de raffinose 10 % (filtrés stérilement) pour un milieu d'induction.

E. Méthodes relatives aux acides nucléiques

E.1. Miniprep d'ADN plasmidique : Kit Miniprep High pure plasmid isolation (Roche)

(Les plasmides utilisés sont repris à la Fig.1)

- Réaliser une culture bactérienne liquide dans 10 ml de milieu LB liquide, à laquelle est ajouté l'antibiotique adéquat. Incuber la culture pendant une nuit à 37°C sous agitation (225 – 250 rpm).
- Placer le « Binding Buffer » sur glace.
- Centrifuger 1,5 ml de culture bactérienne à vitesse maximum (13000 rpm ; Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13) pendant 2 min. Eliminer le surnageant. Répéter deux fois cette opération.
- Ajouter 250 µl de «Suspension Buffer avec RNase» directement sur le culot bactérien. Resuspendre délicatement le culot. Ne pas vortexer si le plasmide est de grande taille.
- Ajouter 250 µl de tampon de lyse. Mélanger 3 à 6 fois par inversion. Ne pas vortexer la solution afin d'éviter la dissociation de l'ADN plasmidique. Incuber maximum 5 min à température ambiante.

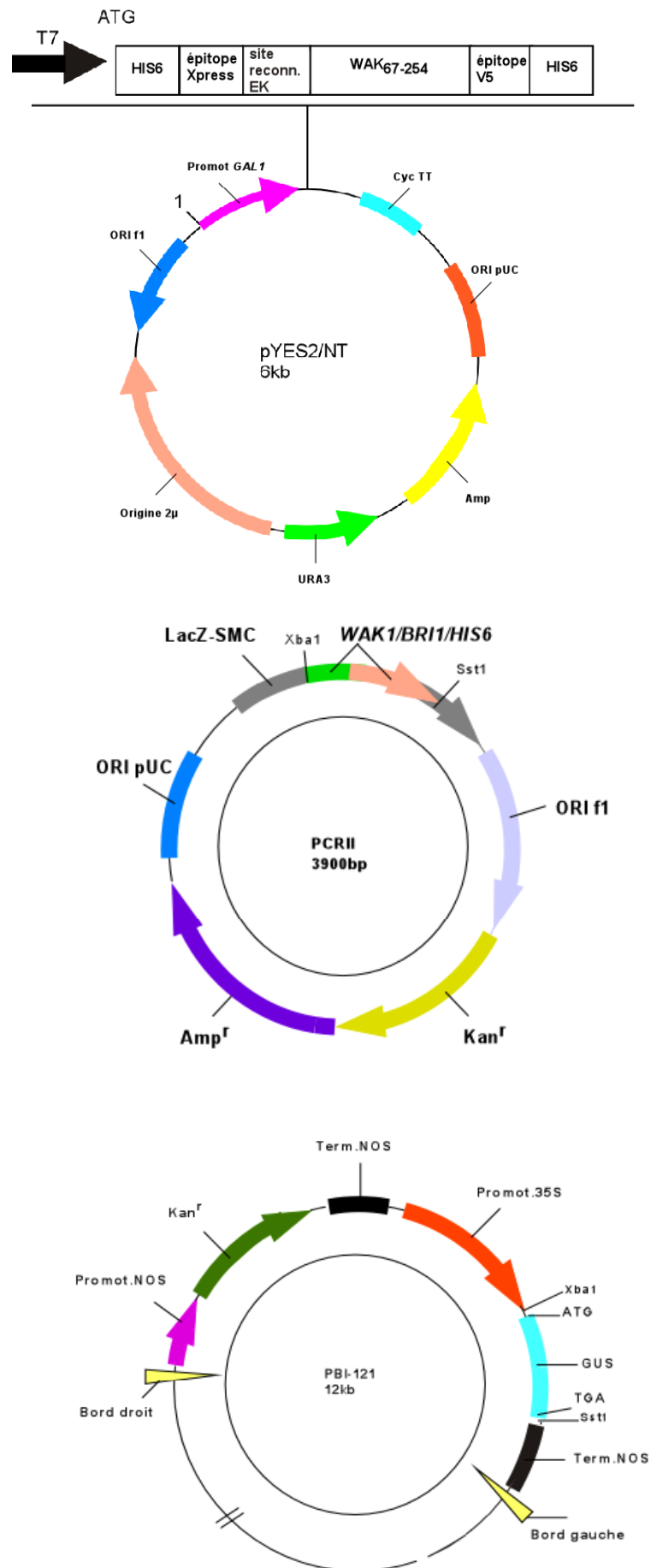


Fig.1 : Vecteurs utilisés.

- Ajouter 350 µl de « Binding Buffer » froid. Mélanger 3 à 6 fois par inversion. Incuber 5 minutes sur glace.
- Centrifuger l'échantillon 10 minutes 13000 rpm à température ambiante (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13). Transférer l'entièreté du surnageant dans le réservoir de la colonne « High Pure » avec filtre.
- Centrifuger 1 minute à vitesse maximale (température ambiante) (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13). Eliminer le liquide filtré.
- Laver la colonne avec 500 µl de «Washing Buffer 1». Centrifuger 1 minute à 13000 rpm (température ambiante) (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13). Laver la colonne avec 700 µl de «Washing Buffer 2». Centrifuger 1 minute à 13000 rpm (température ambiante). Renouveler l'opération.
- Ajouter 70 µl de tampon d'élution sur le filtre de la colonne.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm (température ambiante) (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13) pour récolter l'ADN plasmidique purifié.
- Stocker à -20°C.

E.2. Electrophorèse sur gel d'agarose (ADN)

- Préparer 50 ml d'agarose (Gibco BRL) 1 % dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 4 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) et y ajouter 3 µl de Bromure d'éthidium (BET ; stock à 10 mg/ml ;Sigma).
- Couler le gel dans un support adéquat et placer les peignes.
- Ajouter 1 volume de solution de chargement (bleu de bromophénol 0,025 %, glucose 40 %) à 5 volumes d'échantillon.
- Immerger le gel solidifié dans la cuve d'électrophorèse (Pharmacia biotech GNA 100) contenant du tampon TAE 1X.
- Déposer dans les puits un volume adéquat d'échantillon (ainsi que la standard de taille Smart Ladder (Eurogentec).
- Faire migrer l'échantillon pendant environ 1 h. sous 80-90 mA à 150 V.
- Visualiser les acides nucléiques sur transilluminateur (302 nm-UV).

E.3. Extraction d'ADN d'un gel d'Agarose : QIAEX II Agarose gel extraction kit (Qiagen)

Le principe de la purification QIAEXII repose sur l'adsorption de l'ADN sur des billes silicatées. Une fois les résidus de gel et les contaminants salins éliminés, l'ADN est récupéré par rupture des liaisons ioniques le liant aux billes.

Le protocole complet disponible à l'adresse suivante :

http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/DNACleanupAndConcentration/QIAEX_II/1011033_qiaexii.pdf

- Exciser la bande d'ADN du gel d'agarose avec une lame de scalpel propre.
- Peser le morceau de gel. Ajouter 3 volumes de tampon QX1 pour 1 volume de gel pour les fragments de 100 bp à 4 Kb. Dans les autres cas, suivre la table suivante :

fgts < 100 bp	ajouter 6 volumes de tampon QX1
fgts > 4 Kb	ajouter 3 volumes de tampon QX1 et 2 volumes d'H ₂ O
gel d'agarose > 2%	ajouter 6 volumes de tampon QX1

- Resuspendre les billes QIAEX II en vortexant pdt 30 s.
- Ajouter les billes selon la table ci-dessous et mélanger ; incubé à 50°C pendant 10 min. et mélanger toutes les 2 min pour garder les billes en suspension.

≤ 2 µg d'ADN	ajouter 10 µl de billes QIAEX II
2 – 10 µg d'ADN	ajouter 30 µl de billes QIAEX II
par 10 µg d'ADN supplémentaire	ajouter 30 µl de billes QIAEX II supplémentaires

- Centrifuger pendant 30 s. à 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13) et enlever le surnageant délicatement à la pipette.
- Laver le culot avec 500 µl de tampon QX1 ; centrifuger pendant 30 s. à 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13) et éliminer toutes traces de surnageant à la pipette.
- Laver le culot deux fois avec 500 µl de tampon PE ; centrifuger pendant 30 s. et éliminer toutes traces de surnageant à la pipette.
- Sécher à l'air libre le culot pendant 10 à 15 min. ou jusqu'à ce que le culot soit blanc ; si on a utilisé 30 µl de billes, laisser sécher pendant environ 30 min. (ne pas utiliser de speed-vac).
- Pour éluer l'ADN, ajouter 20 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) et resuspendre le culot ; incubé selon la table ci-dessous :

fragment ADN \leq 4 Kb	incuber à température ambiante pendant 5 min.
fragment ADN de 4 à 10 Kb	incuber à 50°C pendant 5 min.
fragment ADN $>$ à 10 Kb	incuber à 50°C pendant 10 min.

- Centrifuger pendant 30 s. 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13) et transférer prudemment le surnageant dans un nouveau tube eppendorf.

E.4. Purification d'ADN sur colonne « Microcon » (Millipore)

Le système Microcon permet de purifier des échantillons PCR de la polymérase, du tampon, des amorces et des nucléotides non incorporés. Ce système permet également la purification de produits issus de miniprep.

- Déposer sur la colonne X µl d'échantillon et 400 µl d'eau (volume total: max. 450 µl).
- Centrifuger à 7.000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13) pendant 15 min.
- Ajouter 20 µl d'H₂O désionisée sur la colonne et retourner celle-ci sur un nouveau tube récolteur après 5 min. d'incubation à température ambiante.
- Centrifuger à 4.000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13) pendant 10 min. Récolter l'extrait purifié et le stocker à -20°C.

E.5. PCR

Appareils PCR: Minicycler TM (Ml Research, Biozym); GeneAmp PCR system 2400 (pERKIN ELMER) ; PTC-100 Programmable Thermal Controler (Ml Research, Biozym).

Mix : x µl d'ADN (x est fonction de la concentration en ADN) ou colonie bactérienne; 5 µl de tampon PCR 10X (Roche) ; 1 µl de dNTP Mix (10 Mm) (Roche) ; 10 pmoles d'amorce gauche ; 10 pmoles d'amorce droite ; y µl d'H₂O pour atteindre 50 µl. 1 unité de Taq polymérase (Bioloabs)

Programme PCR de base :

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation	95°C	5 min	1
Dénaturation	95°C	1 min	35
Hybridation	55°C (selon T _m)	1 min	35
Elongation	75°C	3 min	35

Les amorces utilisées dans le cadre de ce mémoire sont reprises dans le tableau 1. Les amorces MUTA, MUTD, et D1009P sont utilisées suivant le protocole du kit « QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit » (Stratagene).

Noms des amorces	Séquences nucléotidiques	Tm(°C)
ABWAK1int1	5'-GCCCCCTTCACCAGCTGCGTA-3'	54,4
BRI1int1	5'-GCTTGATGAGAATTTGGAAG-3'	55
Kinase D100P 1	5'-CCGCATATCATCCACAGACCCATGAAATCC-3'	79,5
Kinase D1009P 2	5'-GGATTTTCATGGGTCTGTGGATGATATGCGG-3'	79,5
MUTAa	5'-CTACGACGAGCAAGGAACAACAACTGAGGAGGACAG-3'	84,3
MUTAb	5'-CTGTCCTCCTCAGTTGTTGTTCTTGTCTCGTCGTAG-3'	84,3
MUTDa	5'-GGAGAATGTAATGGTCAAGGTTGCTGCAGAGTC-3'	80,9
MUTDb	5'-GACTCTGCAGCAACCTTGACCATTACATTCTCC-3'	80,9
PCR2HIS1	5'-GGCCGCGAGCTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGTAAATTTCTCC-3'	66,5
VanBRI1g	5'-CCCGGGCATAATGATAGTCTGATTGGT-3'	55
VanWAK1g	5'-TCTAGAATGAAGGTGCAGGAGGGTTTG-3'	55
Forward	5'-CGACAGGGTTTTCCCACTCACGAC-3'	55
Reverse	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'	55

Tableau 1: Amorces nucléotidiques utilisées.

E.6. Mutagenèse dirigée : QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Le protocole est disponible à l'adresse suivante : <http://www.stratagene.com/manuals/200518.pdf>

Cette technique est utilisée pour générer des mutations ponctuelles, des délétions ou des insertions simples ou multiples.

La technique consiste à insérer une mutation à l'aide d'une amplification PCR avec des amorces nucléotidiques contenant la mutation. Le plasmide parental doit être extrait d'une souche d'*E.coli* réalisant la méthylation de l'ADN. L'amplification PCR génère au cours des différents cycles un plasmide muté non méthylé. Le plasmide parental est digéré par l'endonucléase DpnI qui dégrade spécifiquement les ADN méthylés et hémiméthylés. Le plasmide muté est ensuite incorporé dans les bactéries supercompétentes XL-1 Blue (transformation par choc thermique).

Les principales étapes de la mutagenèse dirigée sont représentées à la Fig.2.

- Définir des amorces contenant la mutation, d'une longueur de 25-45 bp, une température de melting proche de 78°C, un rapport de GC proche de 40%.

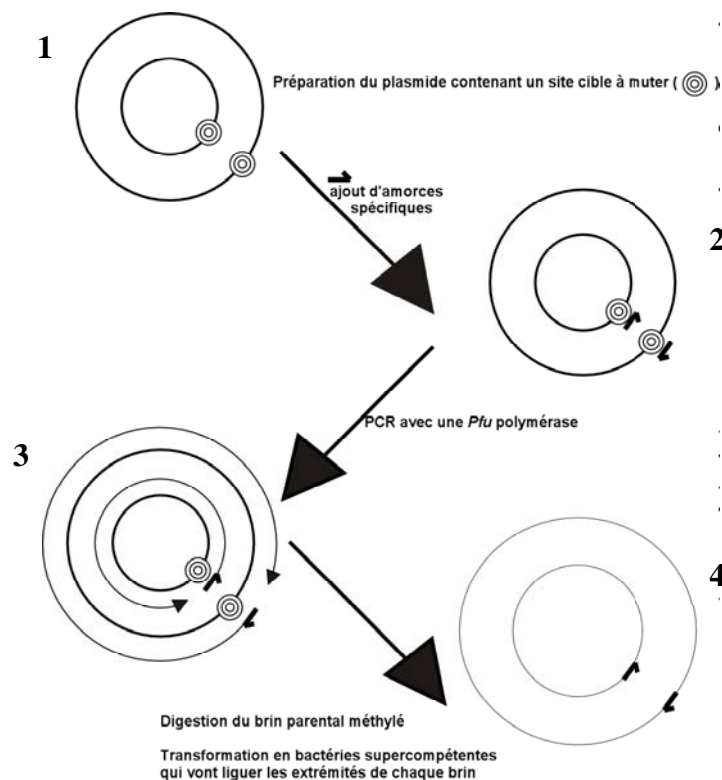


Fig.2: Canevas expérimental de la mutagenèse dirigée en quatre étapes principales. Celles-ci sont 1./ la préparation du plasmide 2./ PCR avec la *Pfu* polymérase 3./ digestion des brins parentaux méthylés 4./ transformation en cellules supercompétentes qui ligueront les deux extrémités des brins néo-formés.

PCR :

Mix : 125 ng d'amorce sens et 125 ng d'amorce antisens, 1 µl de dNTP mix, 5 µl de tampon 10x, 1 µl de plasmide, 1 µl de Pfu Turbo DNA polymerase (2,5 U/µl), eau pour arriver à un volume final de 50 µl.

Programme PCR:

nCycles	Température	Durée
1	95°C	30 s.
12-18	95°C	30 s.
12-18	55°C	1 min.
12-18	68°C	1 min./kb de plasmide

Digestion des plasmides parents :

- Ajouter 1 µl d'enzyme de restriction DpnI (10 U/µl), mélanger et centrifuger 1 min. à 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13).
- Incuber 1 h. à 37°C.

Transformation des bactéries :

- Dégeler sur glace les aliquots de 50 µl de bactéries XL-1 Blue supercompétentes dans un tube Greiner.
- Ajouter 1 µl du produit de la restriction.
- Incuber 30 min. sur glace.
- Placer 45 s. à 42°C puis immédiatement sur glace pendant 2 min.
- Ajouter 500 µl de milieu SOC et incuber pendant 1 h. à 37°C sous agitation (225 rpm).
- Etaler sur un milieu LB solide complémenté d'antibiotiques adéquats et incuber une nuit à 37°C.

E.7. Réaction de ligation : TA cloning kit (Invitrogen)

- Préparer 10 µl de réaction de ligation contenant :
 - Produit PCR frais X µl
 - Tampon ligation 10 X 1 µl
 - Vecteur (Z ng/µl) Z' µl
 - Le volume est porté à 10 µl avec de l'eau désionisée stérile
 - T4 DNA ligase (4.0 unité Weiss) 1 µl

Remarque : x et z dépendent des tailles et quantités du vecteur selon la relation suivante :

$$X \text{ ng produit PCR ou restreint} = (Y \text{ pb produit PCR}) * Z \text{ ng vecteur} / (\text{Taille en pb du vecteur})$$

- Incuber la réaction de ligation à 14°C pendant une nuit.

E.8. Réaction de séquençage

Matériel :

- CEQ DTCS quick start kit.
- CEQ sequencing reaction buffer kit.
- Stop solution : 1 µl de glycogène, 2 µl d'acétate de sodium 3 M, 1,6 µl d'eau, 0,4 EDTA 0,5 M.
- CEQ sample loading solution (SLS).
- SEQ sequencing separation buffer.
- Séquenceur capillaire Beckman CEQ 8000.

Protocole :

- Préparer un mélange contenant 1 µl d'amorce (10 pmoles/µl), X µl d'ADN (à déterminer selon la taille du fragment, voir tableau 1). Ajuster le volume à 10 µl avec de l'eau stérile sans DEPC.
- Dénaturer le mélange à 95°C pendant 15 minutes puis mettre immédiatement sur glace pendant 3 minutes.
- Rajouter 4 µl de CEQ DTCS quick start kit, 1 µl de CEQ sequencing reaction buffer kit, 5 µl d'eau milliQ.
- Lancer une réaction de séquençage avec le programme suivant :

Nombre de cycles	Température	Durée
1 X	92°C	1 min 30 s.
40 X	96°C	20 s.
	50°C	20 s.
	60°C	4 min.

- Après réaction de séquençage, ajouter 5 µl de Stop solution et 60 µl d'éthanol 96 % froid.
- Centrifuger 15 minutes à 13000 g (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13) puis éliminer le surnageant.

- Laver avec 200 µl d'éthanol 76 %, centrifuger 15 minutes à 13000 g (Centrifugeuse Heraeus Sapatech BIOFUGE 13) et éliminer le surnageant. Refaire cette étape une seconde fois.
- Sécher l'ADN au speedvac pendant 25 minutes.
- Resuspendre dans 40 µl de SLS CEQ. Placer l'échantillon dans un puits d'une plaque 96 puits et couvrir celui-ci avec une goutte d'huile minérale.
- Prendre une nouvelle plaque 96 puits, et ajouter dans chaque puits 8 gouttes de SEQ sequencing separation buffer. Placer cette plaque et celle contenant les échantillons à l'endroit prévu dans l'appareil de séquençage.
- Lancer la méthode de séparation LFR-a (CEQ 8000 Genetic analysis system) avec les paramètres suivants :
 1. Température des capillaires lors de la migration : 50°C
 2. Température de dénaturation : 90°C pendant 120 secondes
 3. Injection : voltage 2 kV pendant 15 secondes
 4. Séparation : voltage 4 kV pendant 110 minutes
- Analyser les séquences avec les paramètres d'analyse par défaut.

F. Méthodes relatives aux protéines

F.1. Dosage par la méthode Bradford

- Préparer une gamme étalon de 0,2 à 1 mg/ml de BSA (Sigma) diluée en tampon.
- Déposer 100 µl de chacune des solutions étalons dans des tubes en verre. Le blanc étant constitué de 100 µl de tampon.
- Mettre également 100 µl des échantillons à doser dans des tubes.
- Ajouter 5 ml de réactif de dosage (Bio-Rad Protein assay) préalablement dilué 5x dans l'eau désionisée.
- Vortexer, laisser reposer 5 minutes et lire l'absorbance à 595 nm (Spectrophotomètre SHIMADSU UV-1601).
- Déterminer la concentration en protéines de l'échantillon à partir de la droite de calibration obtenue (Fig.3).

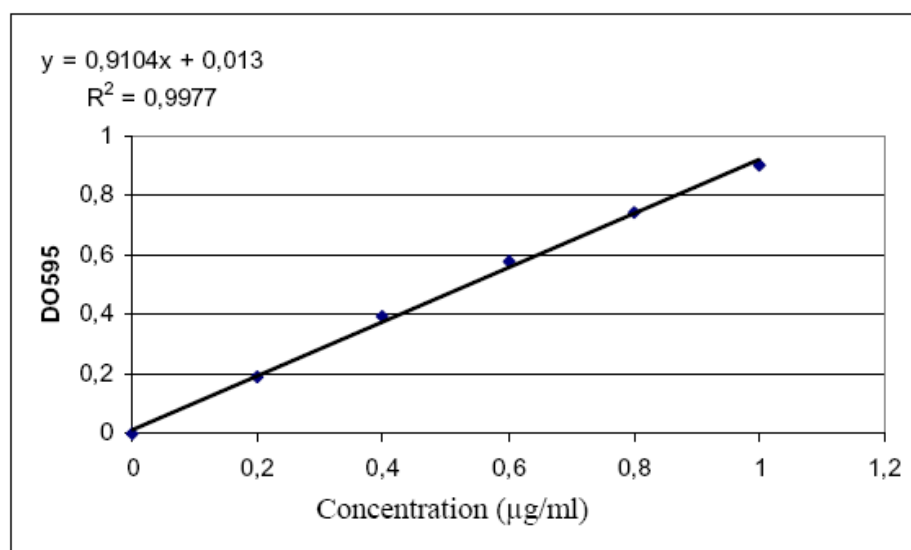


Fig.3 : Courbe de calibration, à partir d'étalons BSA 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,6 µg/ml, 0,8 µg/ml, et 1,0 µg/ml du Bradford.

F.2. Migration sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et Western Blot

F.2.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

Gels :

	Running gel 15%	Stacking gel 5%
Acrylamide mix 30% (Bio-Rad)	2,5 ml	330 µl
Eau	1,1 ml	1,4 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	1,3 ml	
Tris 1,5 M pH 6,8		250 µl
SDS (Sigma)	50 µl	20 µl
APS 10%	50 µl	20 µl
TEMED (Sigma)	2 µl	2 µl

Méthode :

- Monter les plaques d'électrophorèse selon les indications du fabricant (spacers de 0,75 mm d'épaisseur).
- Couler le running gel et couvrir d'éthanol 100 %. Attendre 20 min pour la polymérisation.
- Couler le stacking gel et monter le peigne adéquat.
- Monter les plaques sur le support d'électrophorèse et déposer celui-ci dans la cuve (Cuve Biorad miniprotean II) en suivant les indications du fournisseur.
- Remplir les compartiments de tampon d'électrophorèse Tris 25 mM ; Glycine 250 mM ; pH 8,3 ; SDS 0,1 %.
- Charger le gel avec l'échantillon (en présence de 1X SDS gel loading buffer : Tris-HCl 50 mM ; pH 6,8 ; DTT 100 mM ; SDS 2 % ; Bleu de bromophénol 0,1 % ; Glycérol 10 %) et 5 µl d'étalon de poids moléculaire (Precision Plus Standards, Bio-Rad).
- Régler l'appareil sur 150 V et attendre que le front de migration soit arrivé au bas du gel.
- Le gel peut ensuite être coloré au bleu de Coomassie ou être utilisés en Western-blot.

F.2.2. Coloration des protéines au bleu de Coomassie

- Plonger le gel dans la solution de coloration (bleu de Coomassie (Brillant blue R250) 0,1 % ; méthanol 40 % ; acide acétique 10 % et eau 50 %) pendant 30 minutes.
- Retirer le gel de la solution de coloration et le plonger dans la solution de décoloration (méthanol 40 % ; acide acétique 10 % et eau 50 %) pendant 30 minutes en renouvelant plusieurs fois la solution jusqu'à décoloration adéquate.

F.2.3. Western blot – semi-dry

Protocole de transfert :

- Séparer le gel d'empilement du gel de migration.
- Equilibrer le gel de migration dans le tampon de transfert (48 mM Tris pH 9,2 ; 39 mM Glycine ; 0,0375 % SDS ; 20 % méthanol) pendant 5 min.
- Couper du papier buvard et la membrane PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences) à la dimension du gel de migration.
- Tremper la membrane dans du méthanol pendant 5 s.
- Transférer la membrane dans l'eau distillée pendant 5 min puis l'incuber dans le tampon de transfert pendant 5 min.
- Imbiber les papiers buvards de tampon de transfert. Mettre un papier buvard de chaque côté de la membrane PVDF.
- Assembler la cassette de transfert (Bio-Rad Trans-Blot SD) en évitant les bulles d'air.
- Transférer les protéines pendant 20 min. à 15 V.

- Vérifier l'efficacité du transfert en colorant le gel au bleu de Coomassie (bleu de coomassie (Brillant blue R250) 0,1 % ; méthanol 40 % ; acide acétique 10 % et eau 50 %).

Protocole de révélation de la membrane :

- Saturer la membrane pendant une heure avec la solution de saturation (Tween-20 0,1 % en TBS + 3% de poudre de lait (Gloria-Nestlé))
- Rincer la membrane dans le TBS (Tris-buffered saline : 0,14 M NaCl ; 27 mM KCl ; 25 mM Tris pH 7,4) pendant 5 min sous agitation
- Incuber la membrane à température ambiante pendant 1 h avec l'anti-Xpress monoclonal (Invitrogen) dilué 5000X dans du TBS + 1 % BSA (Sigma)
- Laver la membrane 3 fois à température ambiante avec le TBS + 0,1% Tween-20 pendant 5 min.
- Incuber la membrane pendant 1 h avec l'anticorps secondaire dilué 15000X couplé à la phosphatase alcaline (anti-souris) (Sigma).
- Laver la membrane 3 fois à température ambiante avec le TBS + Tween-20 0,1% pendant 5 min.
- Révéler la membrane avec 10 ml de solution de révélation (0,1 M Tris pH 9,5 ; 0,05 M MgCl₂) + 50 µl NBT (Roche) + 37,5 µl BCIP (Roche).

F.3. Expression d'une protéine totale produite en levure

- Réaliser une préculture de levures recombinantes dans 100 ml de milieu SC-U liquide stérile (milieu minimum sans uracile) contenant 2% de raffinose (Sigma). Incuber à 30°C sous agitation.
- Après 24 h., centrifuger la préculture à 1400 g (centrifugeuse Beckman J2-21) pendant 10 min.
- Diluer les levures (culot) dans le milieu d'induction (800 ml milieu SC-U liquide, raffinose (Sigma) 2 %, galactose (Sigma) 2 %) jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,4. Incuber à 30°C sous agitation pendant 17 h.
- Centrifuger la culture de levure à 1500g durant 10 min. à 4°C (Centrifugeuse Beckman J2-21).
- Resuspendre avec 100 ml d'eau désionisée stérile.
- Centrifuger à 1500g durant 10 min. à 4°C (Centrifugeuse Beckman J2-21).
- Stocker le culot à -80°C.

F.4. Extraction de protéines produites en levure

- Resuspendre le culot de levures dans 14 ml de tampon de lyse dénaturant (6 M guanidine-HCl ; 20 mM tampon phosphate pH 7,8 ; 500 mM NaCl ; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ; 1 µg/ml chymostatine ; 1 µg/ml aprotinine).
- Broyer le culot de levures en présence d'azote liquide.
- Laisser dégeler le broyat à 4°C, puis agiter pendant 10 min. à 4°C.
- Centrifuger le lysat cellulaire à 3000 g durant 15 min. à 4°C (centrifugeuse Beckman Coulter Allegra X-22R). Aliquoter le surnageant en eppendorf de 1,5 ml.
- Recentrifuger à 10000 rpm durant 10 min. à 4°C (Centrifugeuse Heraeus Sepatech BIOFUGE 13). Récupérer les surnageants.
- Stocker à -80°C.

F.5. Purification de protéines recombinantes sur colonne Ni-NTA (colonne His-Bind, BioRad)

Le principe de cette purification de protéine est basé sur l'affinité du tag polyhistidine (extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt) pour des ions Ni²⁺ accrochés sur la résine de la colonne.

Le protocole est disponible à l'adresse suivante : http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/xprpur_man.pdf

Préparation de la colonne

- Resuspendre la résine ProBond en mélangeant par inversion.
- Ajouter 2 ml de résine dans la colonne. Et laisser la résine se tasser 10 min. Eliminer le surnageant.
- Charger la résine.
- Ajouter 6 ml d'eau stérile désionisée et resuspendre la résine en mélangeant par inversion.
- Laisser la résine se tasser et éliminer le surnageant.

- Ajouter 6 ml de Binding Buffer (Urée 8 M ; 20 mM tampon phosphate de sodium pH 7,8 ; NaCl 500 mM).
- Resuspendre la résine par inversion. Laisser la résine se tasser.
- Répéter les deux dernières étapes.

Chargement de la résine (2 ml)

- Laver la colonne deux fois avec 8 ml d'une solution EDTA 50 mM.
- Laver la colonne deux fois avec 8 ml de NaOH 0,5 M.
- Laver la colonne deux fois avec 8 ml d'eau stérile désionisée.
- Charger la colonne avec deux fois 8 ml de NiCl₂ 5 mg/ml.
- Laver la colonne avec deux fois 8 ml d'eau stérile désionisée.

Purification des protéines :

- Ajouter la préparation contenant les protéines recombinantes.
- Incuber pendant 1 h. à température ambiante sous légère agitation. Laisser ensuite la résine se tasser puis éliminer le surnageant.
- Ajouter 8 ml de « Binding Buffer » (Urée 8 M ; 20 mM tampon phosphate de sodium pH 7,8 ; NaCl 500 mM) et mélanger deux minutes. Laisser ensuite la résine se tasser et éliminer le surnageant. Renouveler l'opération.
- Ajouter 8 ml de « Wash Buffer » pH 6,0 (Urée 8 M ; tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,0 ; NaCl 500 mM) et mélanger deux minutes. Laisser ensuite la résine se tasser puis éliminer le surnageant. Renouveler l'opération.
- Ajouter 8 ml de « Wash Buffer » pH 5,3 (Urée 8 M ; tampon phosphate de sodium 20 mM pH 5,3 ; NaCl 500 mM) et mélanger deux minutes. Laisser ensuite la résine se tasser puis éliminer le surnageant. Renouveler l'opération.
- Eluer la protéine recombinante en ajoutant 10 ml de « Elution Buffer » (Urée 8 mM ; tampon phosphate de sodium 20 mM pH 4,0 ; NaCl 500 mM). Récupérer les fractions tous les millilitres.
- Après vérification de la présence de la protéine recombinante dans les éluats (Western blot/coloration au bleu de Coomassie), ces éluats au travers d'une membrane de dialyse (Spectro/Por Membrane, MWCO 1000 ; Polylab) contre du tampon T/Ca/Na. Afin de limiter les risques de précipitation, 1 % de Triton X-100 (Sigma) est ajouté aux éluats avant dialyse.
- Laisser une nuit à 4°C sous une légère agitation.

Rmq : concernant la dialyse de protéines recombinantes, 120µl de Triton X-100 (Sigma) peut être ajouté afin de limiter les risques de précipitation.

F.6. Tests d'interaction (ELISA)

Les plaques utilisées pour les ELISAs sont des plaques 96 puits maxisorp #435494 (NUNC).

Les pectines sont fixées au fond des puits selon le protocole décrit par Liners et ses collaborateurs (1989).

F.6.1. ELISA non compétitifs

- Incuber 50 µl/puits de poly L-lysine (PLL) 0,05mg/ml (Polylysine-HBr, Sigma) pendant 1 heure à température ambiante.
- Laver une fois les puits avec 250 µl de tampon T/Ca/Na (Tris 20 mM pH 8,2; CaCl₂ 0,5 mM ; NaCl 150 mM). Incuber une nuit à 4°C avec 50 µl/puits d'acides polygalacturoniques (Sigma) 400 µg/ml.
- Laver 1 fois les puits avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na.
- Saturer pendant 2 heures avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na + 3 % poudre de lait.
- Laver 1 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na.
- Incuber pendant 2 heures à température ambiante avec 50 µl/puits d'extraits protéiques dilués de façon adéquate en tampon T/Ca/Na.
- Laver 3 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na
- Incuber 1 heure avec 50µl/puits d'anticorps primaire (anti-Xpress, Invitrogen) dilué 1000 fois en tampon T/Ca/Na + 1 % poudre de lait.
- Laver 7 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na.

- Incuber pendant 1 heure avec 50 µl/puits d'anticorps secondaire, une IgG anti-souris couplée à la Horseradish peroxydase (SAM-HRP, Amersham Biosciences) dilué 1000 fois en tampon T/Ca/Na + 1 % poudre de lait.
- Laver 7 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na.
- Révéler durant 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec 100 µl/puits de substrat pour HRP (Enhanced K-blue (Neogen)).
- Lire la plaque (Lecteur de plaque ELISA : ELX800 Universal Microplate Reader – BioTEK Instrument ; programme KCJunior – méthode ELISA ggcar) à 630 nm (longueur d'onde primaire) et à 490 nm (longueur d'onde secondaire).

F.6.2. ELISA compétitifs

F.6.2.1. Interaction entre WAK₆₇₋₂₅₄ et la pectine

- Dé-estérifier 50 µl de fraction pectique pendant 30 min. à 4°C avec 50 µl NaOH 0,05 M fraîchement préparé puis diluer les pectines dé-estérifiées dans 400 µl de tampon T/Ca/Na.
- Incuber les protéines, diluées de manière adéquate, avec les fractions pectiques dé-estérifiées ou non pendant 1 h. à température ambiante.
- En parallèle, saturer pendant 2 h. une plaque préparée comme précédemment décrit (PLL-PGA) avec 250 µl/puits de T/Ca/Na + 3 % poudre de lait.
- Laver 1 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na
- Incuber 2 h avec 50 µl de produit de l'interaction (protéine + fraction pectique).
- Laver 7 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na
- Incuber 1 heure avec 50 µl/puits d'anticorps primaire (anti-Xpress) dilué 1000 fois en tampon T/Ca/Na + 1 % poudre de lait.
- Laver 7 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na.
- Incuber 1 h. avec 50 µl/puits d'anticorps secondaire (SAM-HRP) dilué 1000 fois en tampon Ca/Na +1 % poudre de lait.
- Laver 7 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na.
- Révéler 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec 100 µl/puits de substrat pour HRP Enhanced K-Blue, Neogen).
- Lire la plaque à 630 nm (longueur d'onde primaire) et à 490 nm (longueur d'onde secondaire)

F.6.2.2. Interaction entre l'anticorps 2F4 et la pectine

Protocole Liners et *al.*, 1989.

- Dé-estérifier 50 µl de fraction pectique pendant 30 min. à 4°C avec 50 µl NaOH 0,05 M fraîchement préparé puis diluer les pectines dé-estérifiées dans 400 µl de tampon T/Ca/Na.
- Incuber l'anticorps 2F4, dilué de manière adéquate, avec les fractions pectiques dé-estérifiées ou non pendant 1 h. à température ambiante.
- En parallèle, saturer une plaque préparée comme précédemment décrit (PLL-PGA) pendant 2 h. avec 250 µl/puits de T/Ca/Na + 3 % poudre de lait.
- Laver 1 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na
- Incuber 1 h. avec 50 µl de produit de l'interaction (2F4 + fraction pectique).
- Laver 7 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na
- Incuber 1 h. avec 50 µl/puits d'anticorps secondaire (SAM-HRP) dilué 1000 fois en tampon Ca/Na +1 % poudre de lait.
- Laver 7 fois avec 250 µl/puits de tampon T/Ca/Na.
- Révéler 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec 100 µl/puits de substrat pour HRP Enhanced K-Blue, Neogen).
- Lire la plaque à 630 nm (longueur d'onde primaire) et à 490 nm (longueur d'onde secondaire)

G. Méthode relatives aux polysaccharides

G.1. Extraction de fractions pectiques

Le protocole ci-dessous est décrit pour 20 g de matériel végétal. En fonction de la disponibilité de ce matériel, les volumes des différents réactifs ont été ajustés.

- Broyer 20 g de cellules en suspension ou de plantules d'*A.thaliana* dans un mortier contenant 100 ml d'éthanol absolu à température ambiante.
- Transférer le broyat dans 100 ml d'éthanol absolu bouillant pendant 20 min.
- Centrifuger 5 min. à 3000 g à température ambiante (Centrifugeuse Beckman J2-21).
- Laver le culot avec 100 ml d'éthanol 70%.
- Réaliser un second cycle de centrifugation et de lavage.
- Incuber les échantillons une nuit à 4°C sous agitation (dans 100 ml d'éthanol 70%).
- Laver les culots de centrifugation (3000 g – 5 min. (Centrifugeuse Beckman J2-21) successivement à l'éthanol absolu puis à l'acétone. Laisser l'acétone s'évaporer complètement à température ambiante et peser le résidu insoluble correspondant au matériel de paroi insoluble à l'alcool (MIA).

La suite du protocole est prévue pour 500 mg de matériel insoluble (protocole de Rombouts et Thibault, 1986).

- Resuspendre le matériel insoluble dans 50 ml d'eau. Laisser sous agitation 30 min. Filtrer sous vide (filtre = miracloth). Le filtrat obtenu, nommé WSP, contient les pectines solubles dans l'eau.
- Disperser le matériel solide dans 50 ml d'oxalate d'ammonium 1 % pendant 30 min. Filtrer sous vide (filtre = miracloth). Le filtrat obtenu, nommé OXP, contient les pectines solubles dans l'oxalate.
- Incuber le matériel solide 30 min. dans 50 ml d'HCl 0,05 M à 85°C. Filtrer sous vide (filtre = miracloth). Le filtrat obtenu, nommé HP, contient les pectines solubles dans l'acide.
- Resuspendre le matériel solide dans 50 ml de NaOH 0,05 M à 4°C. Filtrer sous vide (filtre = miracloth). Le filtrat obtenu, nommé OHP, (contient des pectines solubles dans la soude caustique).
- Chaque fraction pectique obtenue a été neutralisée.
- Les fractions pectiques peuvent être concentrées par évaporation au speed-vac.
- Dialyser éventuellement les fractions pectiques au travers d'une membrane de dialyse (Spectro/Por Membrane, MWCO 1000 ; Polylab) contre du tampon T/Ca/Na pendant une nuit à 4°C sous une légère agitation.

G.2. Dosage des sucres totaux par dot sur plaque de silice

- Déposer et sécher 20 µl (4 x 5 µl successifs) de fraction pectique sur la plaque de silice (Silica Gel 60, Merck).
- Immerger et retirer de suite la plaque de silice dans une solution d'H₂SO₄ 10% en éthanol durant 2 s.
- Sécher au four pasteur (>120°C) jusqu'à apparition d'une coloration brunâtre.

G.3. Dosage des acides uroniques par la méthode du métahydroxybiphényle

Lavages de tubes en verre

- Rincer des tubes à l'eau désionisée.
- Immerger des tubes pendant minimum 1 h. dans un bain d'acide sulfurique pur.
- Rincer des tubes à l'eau désionisée.
- Sécher des tubes à l'étuve 50°C.

Dé-estérification des fractions pectiques :

- Mélanger 50 µl de fraction pectique et 50 µl de NaOH 0,05 M fraîchement préparé et incubé pendant 30 min. à 4°C.
- Ajouter 400 µl/échantillon de tampon adéquat.

Dosage proprement dit

- Mélanger 0,2 ml d'échantillon dé-estérifié avec 1ml de H₂SO₄ pur sur glace. Vortexer.
- Incuber 5 min. dans un bain à 100°C puis refroidir sur glace.
- Ajouter 20 µl de métagydroxybiphényle (0,15% dans NaOH 0,5%) et mélanger au vortex.
- Incuber 15 min. à l'obscurité puis lire l'absorbance à 520 nm (Spectrophotomètre Shimadzu UV 1601-PC).
- Calculer la concentration en acides uroniques via la droite de calibration (Fig.4) établie avec les standards ayant subi le même traitement (solutions standard : acides galacturoniques (GalUA) (Sigma) : 22,9 mg/l ; 45,8 mg/l ; 91,6 mg/l ; 228,8 mg/l).

G.4. Protocole HPLC-PAD (High pressure liquid Chromatography – Pulse Amperometry Detection)

- Hydrolyser les fractions pectiques avec du TFA (Trifluoroacetic acid ; sigma) 2M. Chauffer à 120°C durant 1 h.

Les oligopectates ont été analysées par HPLC sur une colonne CarboPac PA 100. Cette colonne contient une résine de polystyrène-divinylbenzène pourvue des groupements sulfites (SO₃⁻) sur lesquels sont greffés des groupements amines (NR₃⁺). A pH 7, les oligos pectates chargés négativement se fixent sur la résine. Ils sont ensuite élués au moyen d'un gradient de NaOAc (de 5 mM à 1 M). Les oligopectates de DP faible, les moins chargés, sont élués les premiers. En sortie de la colonne, les groupements hydroxyles de l'acide galacturonique sont ionisés dans une solution de NaOH (0,5 M). La détection de ces molécules chargées est réalisée au moyen d'un détecteur à ampérométrie pulsée (Dionex).

- Injecter les produits de l'hydrolyse dans l'HPLC.
- Eluer les produits injectés via un gradient de NaOAc (5 mM à 1 M).
- Calculer la concentration en acides uroniques des fractions testées à partir des réponses des standards injectés.

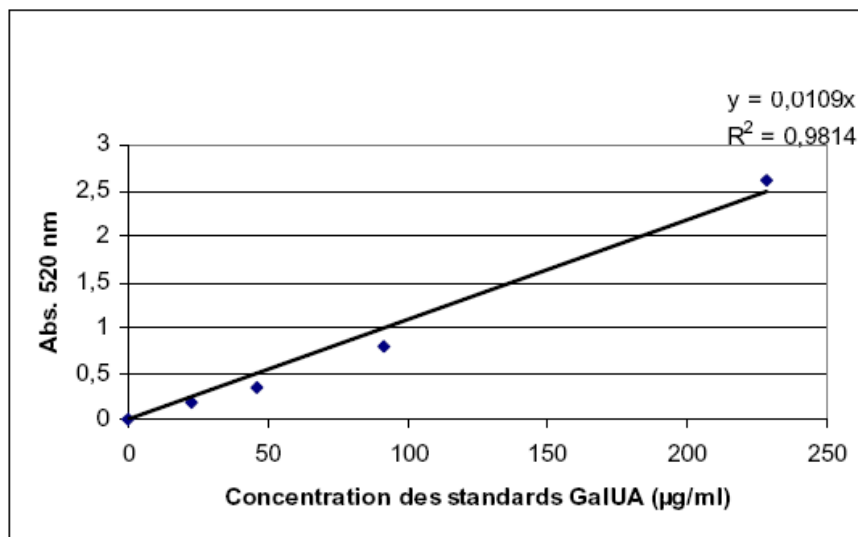


Fig.4 : Droite de calibration du dosage des acides uroniques par la méthode du métagydroxybiphényle. Les concentrations en acides homogalacturoniques (GalUA) des standards utilisés sont : 22,9 µg/ml ; 45,8 µg/ml ; 91,6 µg/ml ; 228,8 µg/ml.

RESULTATS & DISCUSSION

A. Construction de récepteurs hybrides et transformation d'*Arabidopsis thaliana*

A.1. Préambule

Ce mémoire est basé sur le concept du récepteur hybride. Une telle construction, fut réalisée en 2004 au laboratoire par V. Ransbotyn en se basant sur les travaux de He *et al.*, 2000. La chimère construite (Fig.1) comprend les domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire du récepteur à étudier, WAK1, et le domaine intracellulaire du récepteur BRI1. Le domaine kinase de BRI1 fut choisi car des cibles spécifiques de la cascade transductionnelle de ce récepteur sont connues : *TCH4*, *BRH1*, *CycD3*. Ce couplage d'un domaine de perception d'un récepteur d'une voie de transduction avec le domaine kinase d'un récepteur d'une seconde voie de transduction devrait permettre l'activation du récepteur hybride par des ligands de la première voie et l'activation de cibles de la seconde voie. Dans notre cas, le domaine de perception du récepteur WAK1 étant couplé au domaine kinase de BRI1, l'activation du récepteur hybride par la pectine permettrait l'activation de cibles de la voie du récepteur BRI1 et prouverait le rôle signalétique de WAK1.

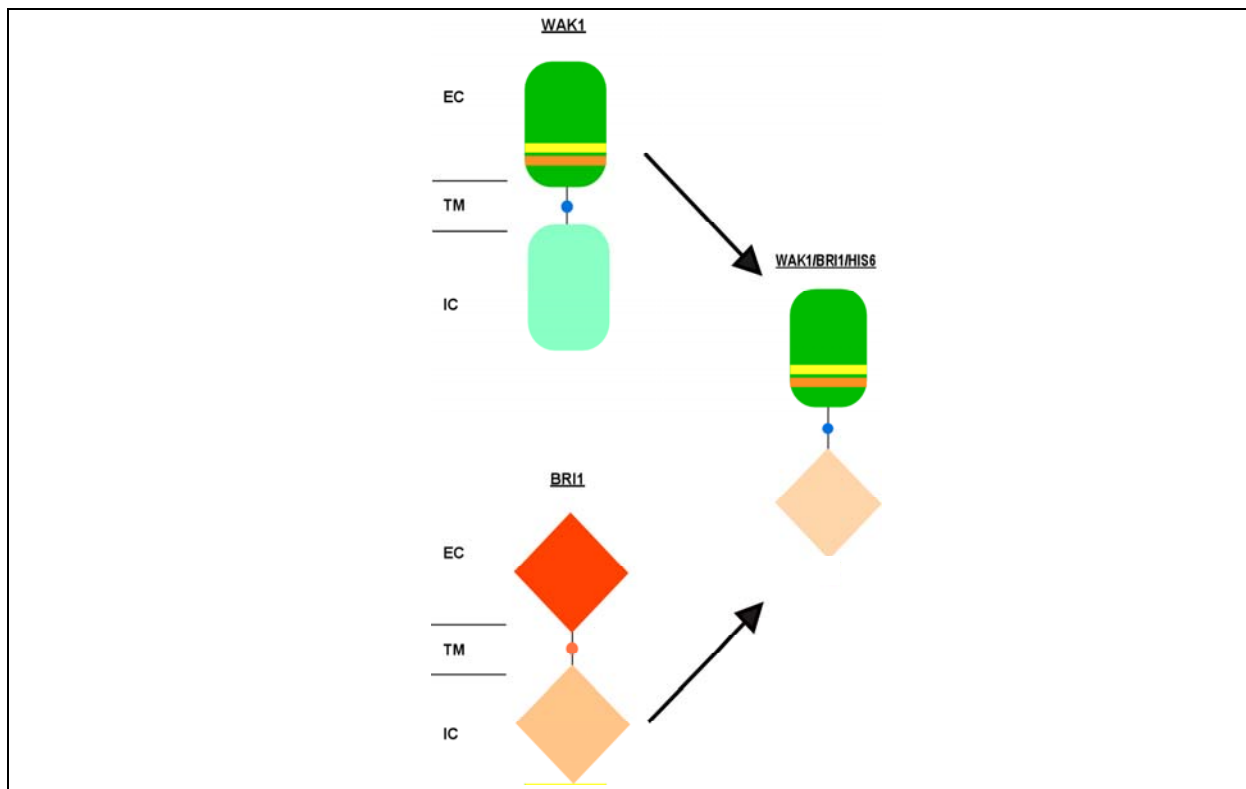


Fig.1 : Schématisation du récepteur hybride WAK1/BRI1. Celui-ci résulte d'une fusion entre les domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire du récepteur WAK1 et du domaine intracellulaire du récepteur BRI1. EC : extracellulaire ; TM : transmembranaire ; IC : intracellulaire.

A.2. Schéma expérimental suivi

Le but de cette première partie du mémoire est l'obtention de la construction du récepteur hybride et la transformation d'*Arabidopsis thaliana*. Le canevas expérimental suivi est représenté à la figure 2.

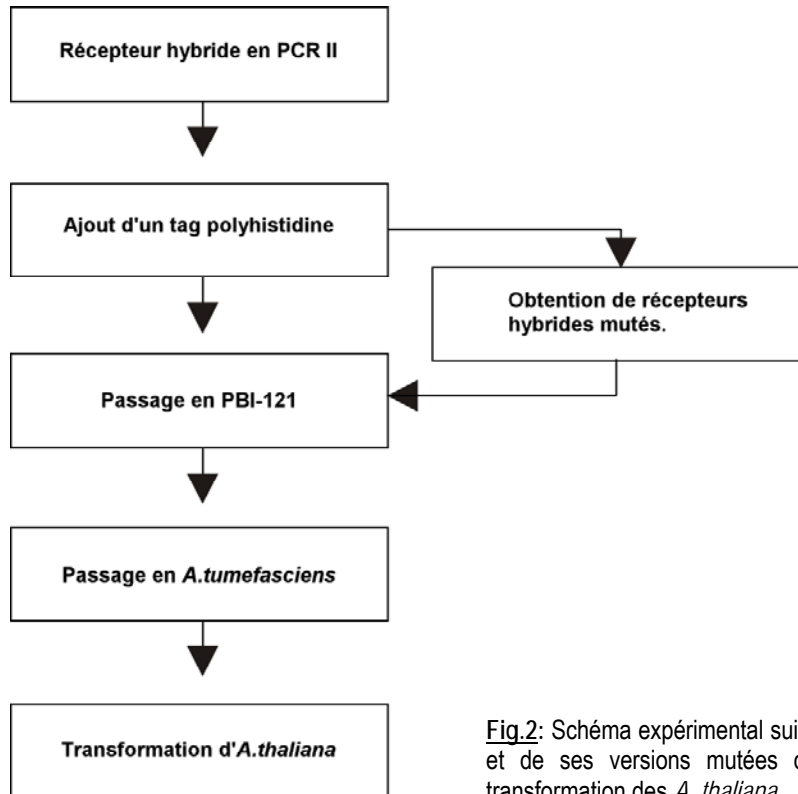


Fig.2: Schéma expérimental suivi pour la construction de *WAK1/BR1* et de ses versions mutées dans le vecteur PCR II jusqu'à la transformation des *A. thaliana*.

Dans une première étape, nous avons rajouté la séquence codant un tag polyhistidine à *WAK1/BR1*. Nous avons dans un second temps construit des versions mutées du récepteur hybride. Dans un troisième temps, nous avons cloné les séquences codant les récepteurs hybrides, mutés ou non, dans PBI-121. Enfin, des plantes ont été transformées par l'intermédiaire d'*A.tumefasciens* contenant *WAK1/BR1/HIS6* inséré en PBI-121.

En Fig.3, la position de chaque amorce utilisée dans ce mémoire est représentée sur la séquence codant le récepteur hybride.

A.3. Clone initial

Nous avons utilisé le clone bactérien (*E.coli* top10 f⁺) comprenant la séquence codant le récepteur hybride *WAK1/BR1* inséré dans le vecteur de clonage PCR II (Fig.4). L'insert *WAK1/BR1* se trouve au niveau des sites de restriction *Xba*I et *Sst*I.

La sélection des bactéries contenant la séquence encodant le récepteur hybride *WAK1/BR1* a été effectuée sur

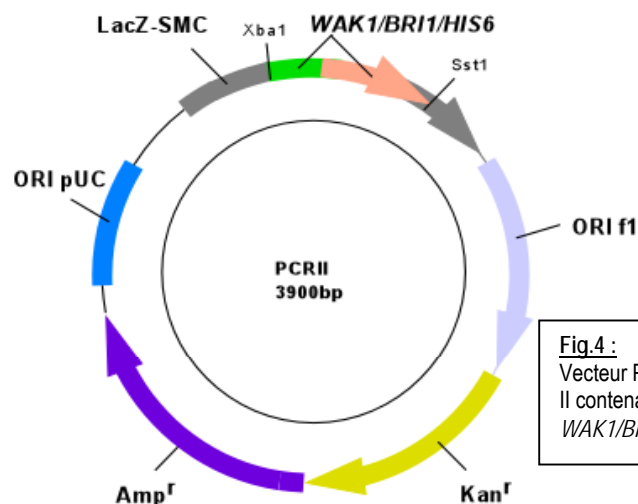


Fig.4 : Vecteur PCR II contenant *WAK1/BR1*

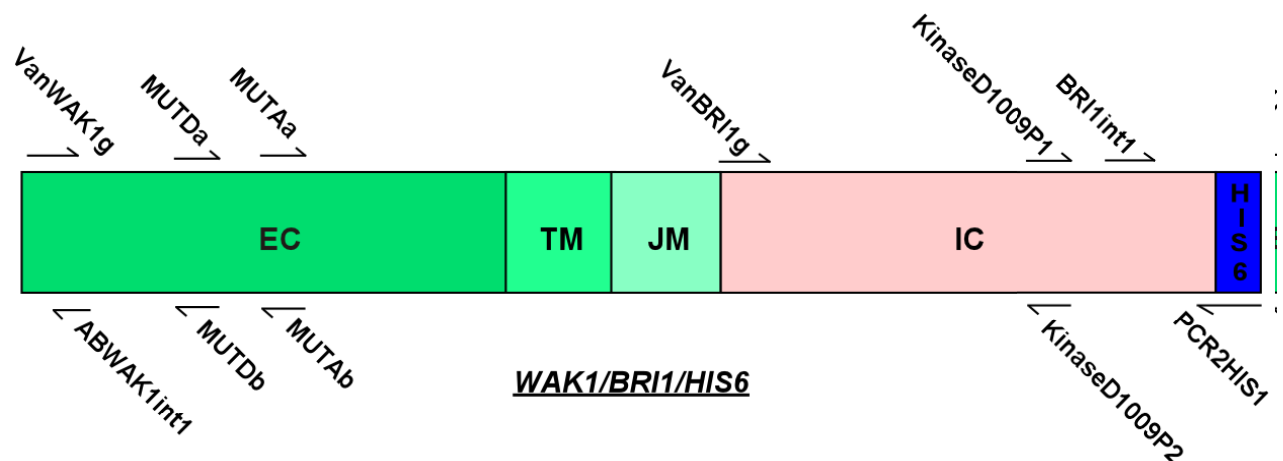


Fig.3: Position des diverses amorces nucléotidiques sur la séquence codant les différents domaines du récepteur hybride *WAK1/BRI1/HIS6*.

EC=extracellulaire
 TM=transmembranaire
 JM=juxtamembranaire
 IC=intracellulaire
 HIS6=tag polyhistidine

Noms des amorces	Séquences nucléotidiques	Tm(°C)
ABWAK1int1	5'-GCCCCCTTCACCAGCTGCGTA-3'	54,4
BRI1int1	5'-GCTTGATGAGAATTTGGAAG-3'	55
Kinase D100P 1	5'-CCGCATATCATCCACAGACCCATGAAATCC-3'	79,5
Kinase D1009P 2	5'-GGATTTTCATGGGTCTGTGGATGATATGCGG-3'	79,5
MUTAa	5'-CTACGACGAGCAAGGAACAACAACTGAGGAGGACAG-3'	84,3
MUTAb	5'-CTGTCCTCCTCAGTTGTTGTTCTTGCTCGTCGTAG-3'	84,3
MUTDa	5'-GGAGAATGTAATGGTCAAGGTTGCTGCAGAGTC-3'	80,9
MUTDb	5'-GACTCTGCAGCAACCTTGACCATTACATTCTCC-3'	80,9
PCR2HIS1	5'-GGCCGCGAGCTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGTAAATTTTCTCC-3'	66,5
VanBRI1g	5'-CCCGGGCATAATGATAGTCTGATTGGT-3'	55
VanWAK1g	5'-TCTAGAATGAAGGTGCAGGAGGGTTTG-3'	55

milieu sélectif comprenant de l'ampiciline. Nous avons, avant de débiter les expérimentations proprement dites, vérifié l'intégrité du clone utilisé. Pour cela, une miniprep suivie d'une restriction diagnostique avec les enzymes XbaI et SstI a été réalisée. Après cette vérification, nous avons ajouté la séquence codant un tag polyhistidine à la suite de *BRII* de *WAK1/BRII*. Ce tag permettra, dans des étapes ultérieures, de vérifier la localisation sub-cellulaire du récepteur hybride dans les cellules d'*A. thaliana* transformées.

A.4. Ajout d'un tag polyhistidine (HIS₆)

Nous avons défini une amorce PCR (PCR2HIS1 : 5'-GGCCGCGAGCTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTAAATTTTCCTCC-3') de telle manière à rajouter en phase la séquence encodant le tag polyhistidine. Par PCR, au moyen des amorces PCR2HIS1 et VanWAK1g, la séquence nucléotidique de 2076 bp codant pour le récepteur WAK1/BRII (2058 bp) muni d'une séquence supplémentaire codant pour le tag polyhistidine (18 bp) a été obtenue. La nomenclature dorénavant utilisée pour désigner cette construction, c'est à dire la séquence codant le récepteur hybride couplé au tag polyhistidine, est *WAK1/BRII/HIS6*.

Le produit PCR obtenu a été purifié par Microcon et ligué dans le vecteur PCR II au moyen d'une « T4 DNA polymérase ». La figure 5 montre la migration sur gel d'agarose 1 % du produit de la miniprep de *WAK1/BRII/HIS6* en PCR II.

Des bactéries *E.coli* top 10f⁺ ont été transformées par choc thermique avec PCR II-*WAK1/BRII/HIS6*. Les bactéries positives (contenant *WAK1/BRII/HIS6*) ont été sélectionnées sur un milieu riche contenant de l'ampiciline. Un criblage des colonies bactériennes par PCR avec le couple d'amorces PCR2HIS1/VanWAK1g a permis de confirmer la présence de *WAK1/BRII/HIS6* (Fig.6).

Un séquençage avec les amorces Forward/Reverse a confirmé l'intégrité de la construction *WAK1/BRII/HIS6* ainsi que le non décalage du cadre de lecture.

L'alignement de la séquence nucléotidique théorique du domaine kinase de *BRII* (At4g39400) avec la séquence codant le domaine kinase du récepteur hybride *WAK1/BRII* a mis en évidence des variations de nucléotides entre ces deux séquences. Afin de vérifier l'absence de mutations ponctuelles, la traduction *in silico* des séquences nucléotidiques en séquences protéiques a été réalisée. Aucune variation d'acide aminé entre ces deux séquences protéiques n'a été découverte. Les variations au niveau des séquences nucléotidiques pourraient donc correspondre à des SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

L'étape suivante a été de construire des versions mutées de *WAK1/BRII/HIS6* en se basant sur les travaux de He et ses collaborateurs (2000).

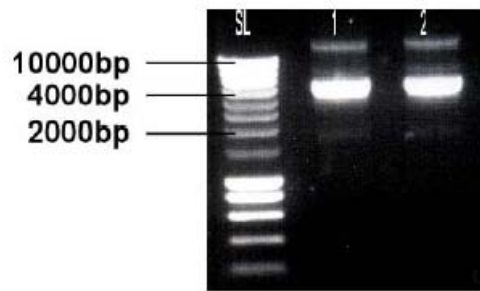


Fig.5: Migration sur gel d'agarose 1% + BET des produits miniprep de PCR II contenant *WAK1/BR11/HIS6* montrant une bande de 5976 bp correspondant au vecteur PCR II (3900 bp) contenant la séquence codant pour le récepteur *WAK1/BR11/HIS6* (2076bp).

SL : Smart Ladder.

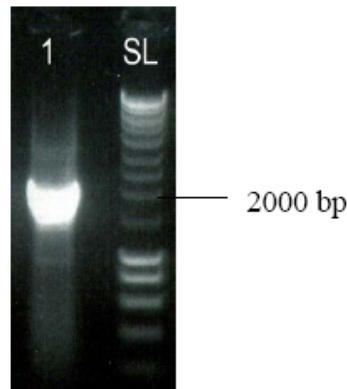


Fig.6: Migration sur gel d'agarose 1 % + BET du produit PCR obtenus avec les amorces PCR2HIS1 et VanWAK1g. Un fragment d'ADN de 2078 bp correspondant à *WAK1/BR11/HIS6* est amplifié.

SL : Smart Ladder

A.5. Conception de versions mutées des récepteurs hybrides

La démarche de concevoir des récepteurs hybrides mutés comme contrôles négatifs est similaire à celle de He *et al.*, 2000. Les récepteurs hybrides mutés ne pourront plus ni être activés ni initier une voie de transduction du signal.

Quatre versions mutées du récepteur hybride ont été conçues : trois concernent le domaine extracellulaire de *WAK1* ; une, le domaine intracellulaire kinase de *BR11* (Fig.7).

A.5.1. Choix des mutations

A.5.1.1. Mutations au niveau du domaine extracellulaire de WAK1 du récepteur hybride

Le but de ces mutations est de rendre impossible l'interaction entre le domaine extracellulaire de *WAK1* et les pectines. L'activation du récepteur par les pectines serait

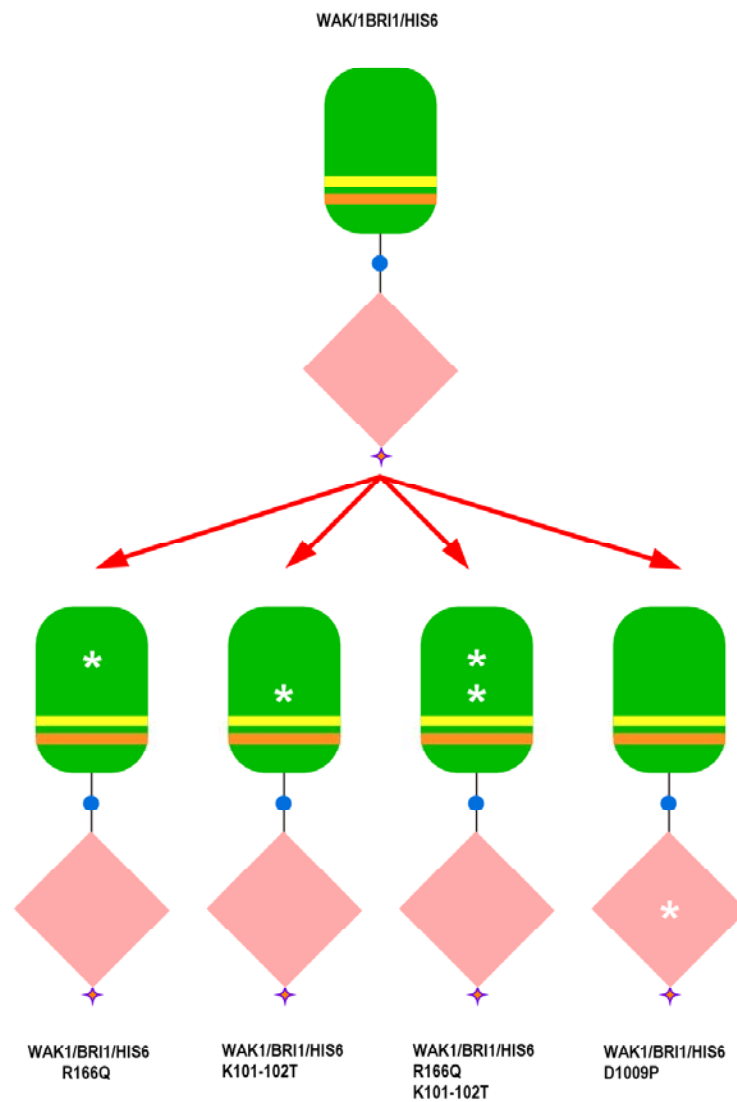


Fig.7: Schématisation des quatre versions mutées dérivées du récepteur hybride obtenues par mutagenèse dirigée. Chaque mutation est représentée par une étoile blanche. Le tag polyhistidine est représenté par une étoile mauve. Les acides aminés mutés sont indiqués en dessous de chaque construction.

à des amorces oligonucléotidiques anti-complémentaires l'une de l'autre et contenant la/les mutation(s) désirée(s).

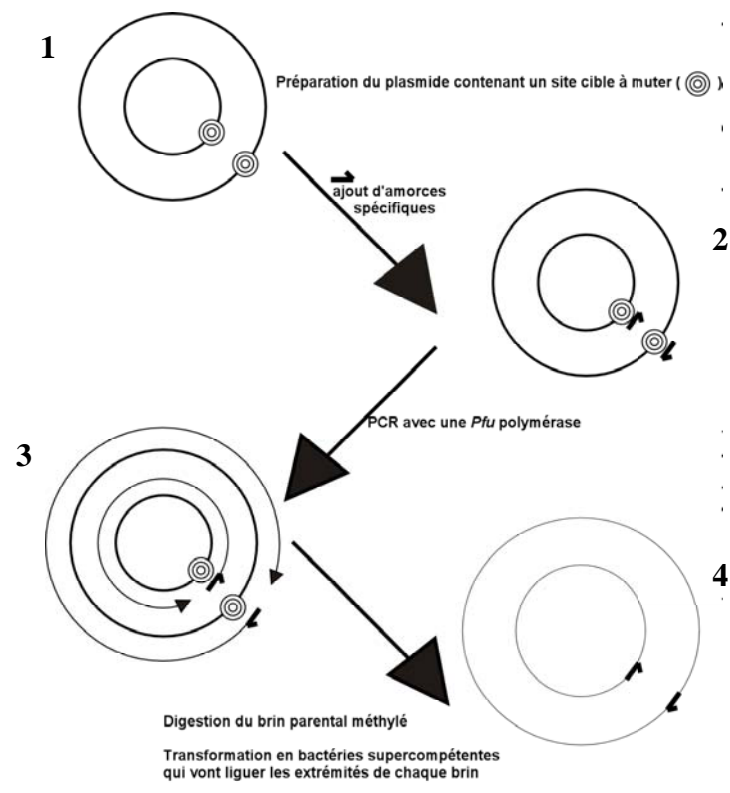


Fig.9: Canevas expérimental de la mutagenèse dirigée en quatre étapes principales. Celles-ci sont 1./ la préparation du plasmide 2./ PCR avec la *Pfu* polymérase 3./ digestion des brins parentaux méthylés 4./ transformation en cellules supercompétentes qui liqueront les deux extrémités des brins néo-formés.

Amorces utilisées pour les expériences de mutagenèse dirigée (les mutations ponctuelles apparaissent en gras) :

MUTa (K101T-K102T): 5'-CTACGACGAGCAAGGAACAACA**ACT**GAGGAGGACAG-3'

MUTab (K101T-K102T) : 5'-CTGTCCTCCTCAGTTGTTGTT**CCT**TGCTCGTCGTAG-3'

MUTDa (R166Q): 5'-GGAGAATGTAATGGTCAAGGTTGCTGCAGAGTC-3'

MUTDb (R166Q) : 5'-GACTCTGCAGCAACCTTGACCATTACATTCTCC-3'

Kinase D100P 1 (D1009P): 5'-CCGCATATCATCCACAGACCCATGAAATCC-3'

Kinase D1009P 2 (D1009P): 5'-GGATTT**CAT**GGGTCTGTGGATGATATGCGG-3'

L'amplification PCR a généré des plasmides PCR II contenant les versions mutées de *WAK1/BR11/HIS6* qui se distinguent des plasmides parentaux par l'absence de méthylation. Les plasmides méthylés ont ensuite été digérés par l'endonucléase DpnI (Stratagene) reconnaissant les sites méthylés 5'-Gm⁶ATC-3'. Des bactéries supercompétentes *E.coli* XL-1 blue ont ensuite été transformées par choc thermique avec PCR II contenant la séquence codant les versions mutées du récepteur hybride et sélectionnées sur milieu sélectif contenant de l'ampiciline. Un criblage par PCR sur colonies a ensuite été effectué avec les amorces reverse et forward. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Un amplicon de 2317 bp a ainsi été mis en évidence (Fig.10B). Cet amplicon confirme la présence de la séquence codant le récepteur hybride inséré en PCR II au sein des bactéries testées. Une deuxième PCR, avec un couple d'amorces spécifiques de l'insert (PCR2HIS1/VanWAK1g) a également permis de confirmer la présence de l'insert *WAK1/BR11/HIS6* de 2076 bp. Certaines colonies n'ont montré aucun produit PCR. Celles-ci n'avaient apparemment pas incorporé le vecteur PCR II dans lequel est inséré *WAK1/BR11/HIS6* (Fig.10A). La bande floue de faible poids moléculaire observée lors de la migration électrophorétique correspond probablement aux amorces utilisées. L'absence de vecteur PCR II laisse à croire que ces colonies pourraient être des colonies satellites.

La confirmation de la présence de l'insert d'intérêt par ces méthodes diagnostiques ne donnant aucune indication concernant le résultat de la mutagenèse proprement dite, les clones positifs ont été séquencés à partir de minipreps avec les amorces nucléotidiques

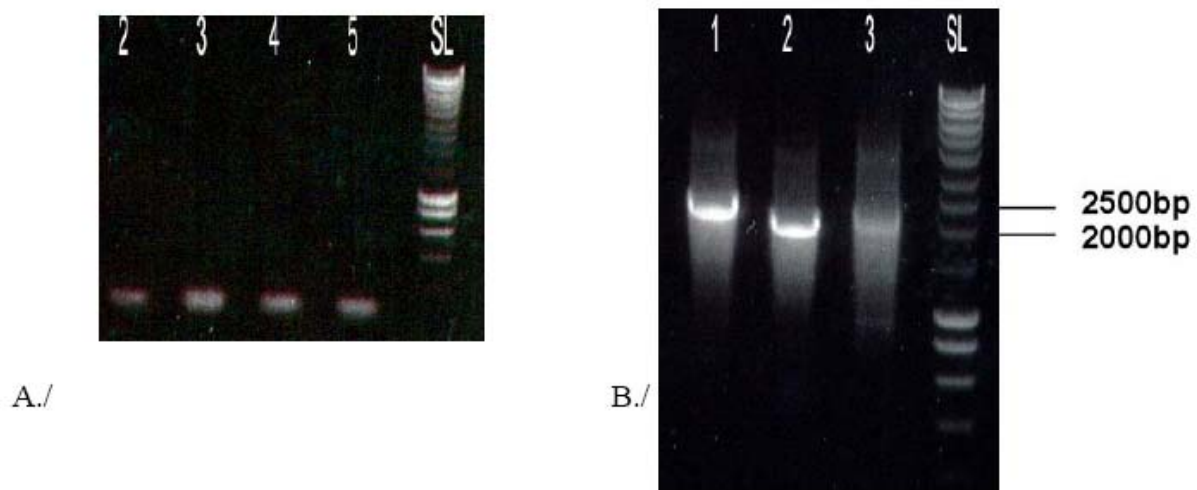


Fig.10 : Migration sur gel d'agarose 1% + BET des produits PCR sur colonies afin de vérifier la présence d'un insert *WAK1/BR11/HIS6* muté après l'étape de mutagenèse dirigée.

A./ Colonies sans vecteur (amorces Forward/Reverse).

B./ Colonies contenant l'insert d'intérêt

1./ Amplification avec les amorces Forward/Reverse montrant un amplicon de 2317 bp.

2./ 3./ Amplification avec les amorces PCR2HIS1/VanWAK1g montrant un amplicon de 2076bp.

SL : Smart Ladder.

VanWAK1g: 5'-TCTAGAATGAAGGTGCAGGAGGGTTTG-3' et VanBRI1g: 5'-CCCGGGCATAATGATAGTCTGATTGGT-3'.

Des alignements entre la séquence nucléotidique théorique de *WAK1* (At1g21250) et les résultats des séquençages de clones *R116Q*, *K101-102T* et *R166Q/K101T-K102T*, ainsi qu'entre celles de *BRI1* (At4g39400) et le clone *D1009P*, ont été effectués. Ces alignements ont permis de vérifier l'absence de mutations ponctuelles qui auraient pu être induites par des erreurs de la *Pfu* (polymérase utilisée pour l'étape PCR de la mutagenèse dirigée).

A ce stade du travail, nous avons obtenu cinq constructions (une sauvage et quatre mutées). Ces constructions seront introduites dans un vecteur de transformation de plantes et utilisées pour la transformation d'*A. thaliana*.

A.6. Transformation de fleurs d'*A. thaliana*

La méthode de transformation que nous avons choisi est médiée par la bactérie *A.tumefaciens*. Cette agrobactérie contient un plasmide désarmé (dépourvu des gènes de tumorigénèse naturellement présents) portant les gènes *Vir* nécessaires au transfert de l'ADN-T de l'agrobactérie dans le génome de la plante hôte. L'ADN-T est délimité par des bords gauche et droit et est porté par un autre vecteur, le vecteur binaire PBI-121 (dans notre cas). PCR II ne contenant pas de telle région, nous avons transféré les séquences encodant les récepteurs hybrides dans le vecteur PBI-121. Celui-ci comprend une origine de réplication fonctionnelle à la fois chez l'agrobactérie et chez *E.coli*.

A.6.1. Clonage de *WAK1/BRI1/HIS6* et de ses versions mutées dans le vecteur PBI-121

PBI-121 (Fig.11) est un vecteur de 12 kb classiquement utilisé lors de transformations de plantes par *Agrobacterium tumefaciens*. L'ADN-T porte le gène codant pour la glucoronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur 35S constitutif de la mosaïque du chou-fleur et du terminateur NOS-ter. L'ADN-T délimité par des bords gauche et droit contient également un marqueur de résistance à la kanamycine sous le contrôle du promoteur et du terminateur du gène de la nopaline synthase (NOS-pro ; NOS-ter). L'expression de ce marqueur de résistance permet de réaliser des sélections de plantes dans le génome desquelles l'ADN-T s'est intégré.

La séquence d'intérêt (*WAK1/BRI1/HIS6*) sera insérée derrière le promoteur 35S en remplacement de GUS.

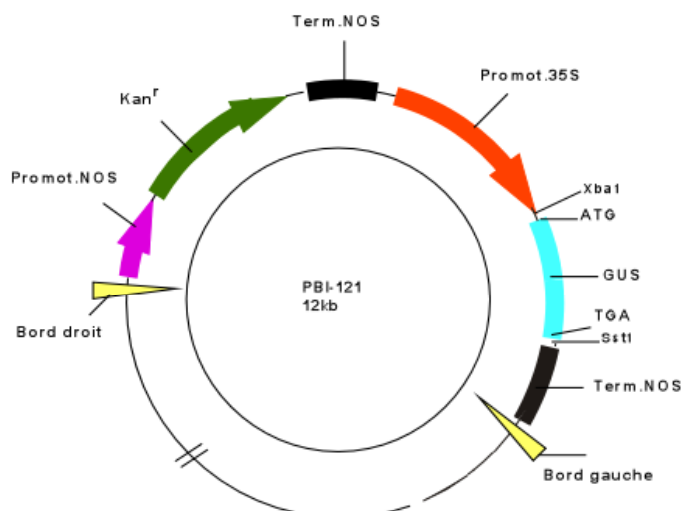


Fig.11: Le vecteur PBI-121 contenant l'ADN-T entre les bords gauche et droit.

Le canevas expérimental du clonage de *WAK1/BRI1/HIS6* dans PBI-121 est repris à la figure 12. Ce clonage consiste à isoler l'insert d'intérêt par restriction enzymatique (*Xba*I et *Sst*I) de PCR II. En parallèle, et suivant le même principe, GUS est sorti de PBI-121. *WAK1/BRI1/HIS6* est ensuite ligué dans PBI-121.

Le plasmide PCR II contenant l'insert d'intérêt *WAK1/BRI1/HIS6* a été restreint avec les enzymes de restriction *Sst*I et *Xba*I, libérant ainsi un fragment de 2076 bp correspondant à *WAK1/BRI1/HIS6* et un fragment de 3900 bp correspondant à PCR II (Fig.13). Après migration sur gel d'agarose 1 %, le fragment d'ADN de 2076 bp a été excisé du gel sous transilluminateur UV et a été purifié par la méthode QIAEX II.

Parallèlement, le plasmide PBI-121 a été restreint avec les enzymes *Xba*I et *Sst*I, libérant un fragment d'ADN de ~11kb correspondant au vecteur PBI-121 (12 kb) et un

fragment de 1812 bp correspondant à GUS. Après migration sur gel d'agarose 1 % (Fig.14), le fragment de 11 kb a été excisé du gel sous transilluminateur UV et purifié par la méthode QIAEX II.

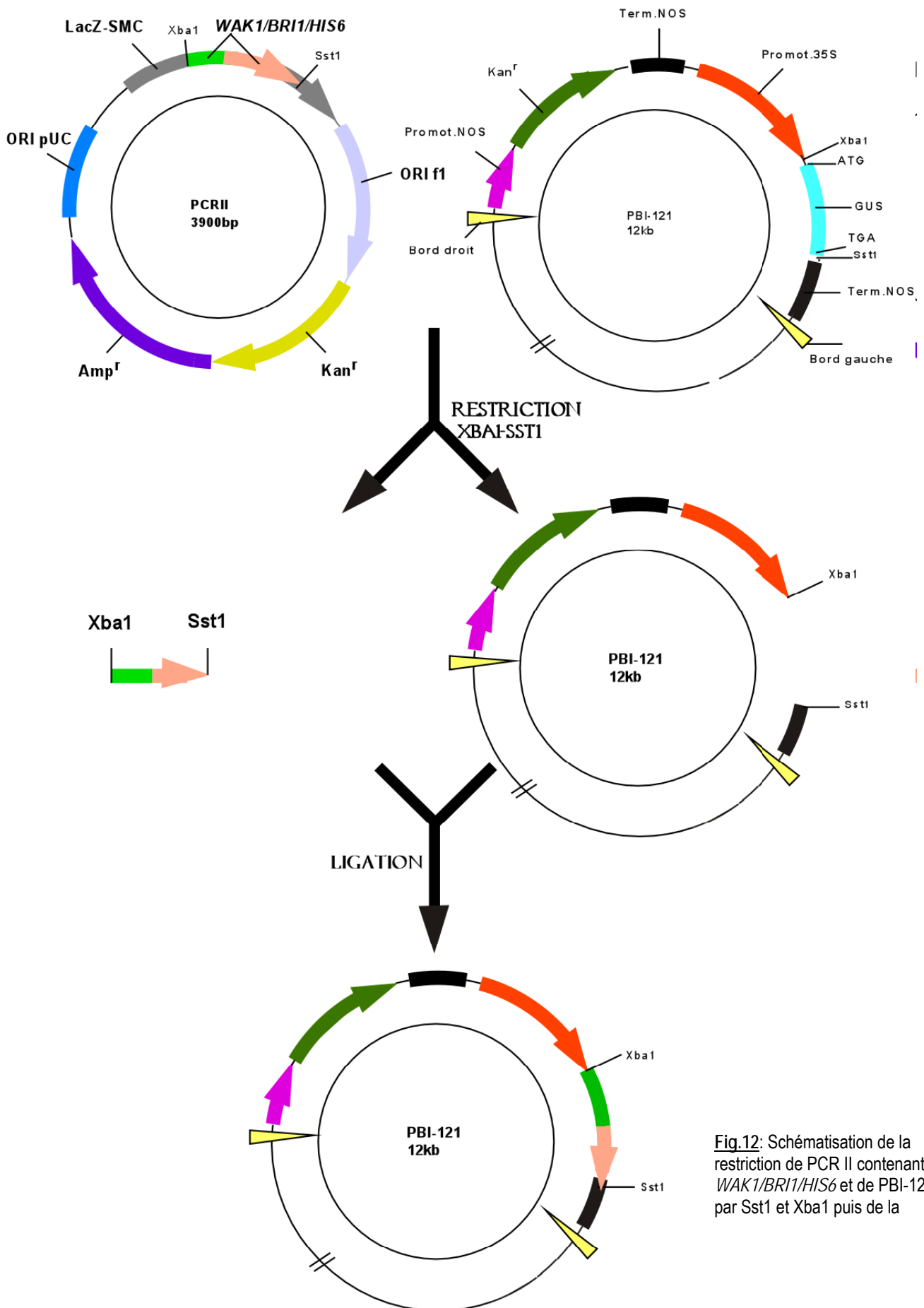


Fig.12: Schématisation de la restriction de PCR II contenant *WAK1/BRI1/HIS6* et de PBI-121 par *Sst1* et *Xba1* puis de la

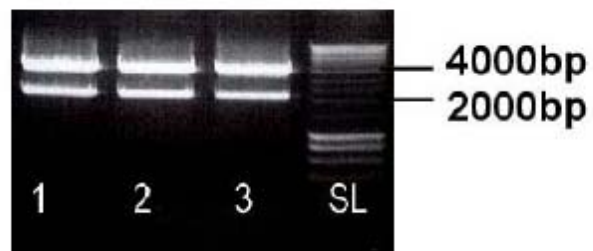


Fig.13 : Migration sur gel d'agarose 1% + BET de produits de restriction de PCR II contenant *WAK1/BR11/HIS6* par Sst1 et Xba1.

1-3 : *WAK1/BR11/HIS6* (bande inférieure, 2076bp) hors de PCR II (bande supérieure, 3900bp).

SL : Smart Ladder.

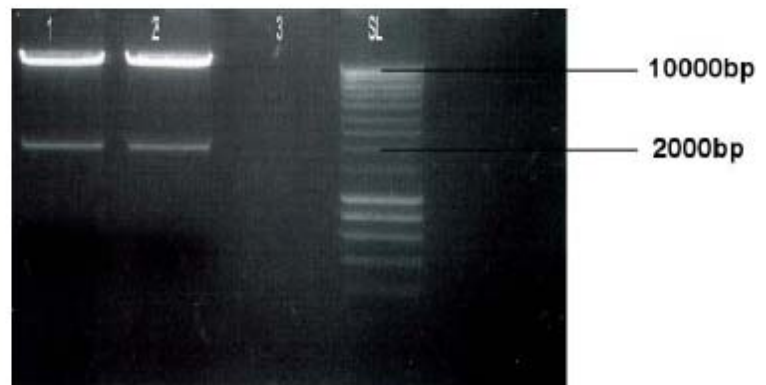


Fig.14 : Migration sur gel d'agarose 1% + BET de produits de restriction de PBI-121 par Sst1-Xba1.

1-2 : PBI-121: bande supérieure de 11kb.

Séquence codant GUS : bande inférieure de 1812 bp.

SL : Smart Ladder.

Le plasmide linéarisé PBI-121 dépourvu de GUS et *WAK1/BRI1/HIS6* ont été ligués via une T4 DNA ligase (4 unités WEISS ; Invitrogen).

Des bactéries *E.coli* top10F' ont été transformées par choc thermique avec le produit de ligation PBI-121 contenant l'insert *WAK1/BRI1/HIS6*. Un criblage par PCR des colonies se développant sur milieu sélectif (kanamycine) avec les amorces Reverse/ABWAK1int1 et Forward/BRI1int1 (ABWAK1int1: 5'-GCCCCTTCACCAGCTGCGTA-3' et BRI1int1: 5'-GCTTGATGAGAATTTGGAAG-3') a permis de confirmer l'incorporation de *WAK1/BRI1/HIS6* en PBI-121 (Fig.15). L'ensemble des insertions a été vérifié par séquençage.

A ce stade, les séquences codant le récepteur hybride et ses dérivés mutés, tous marqués du tag polyhistidine, sont disponibles dans le vecteur de transformation PBI-121. Ces différents vecteurs seront utilisés pour transformer successivement *Agrobacterium tumefaciens* et *Arabidopsis thaliana*.

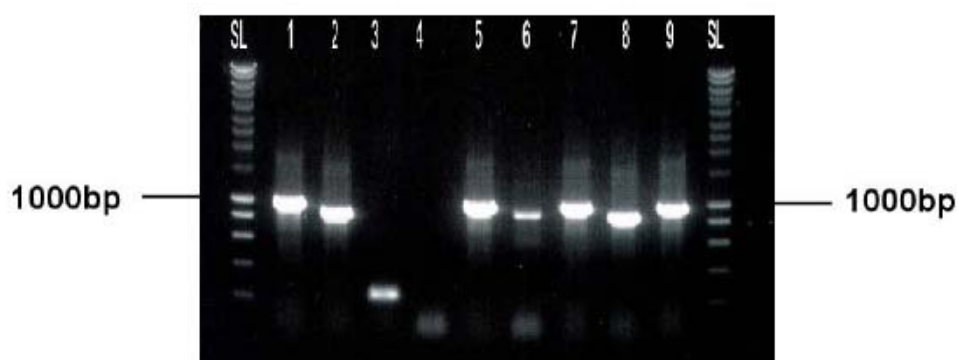


Fig.15: Migration sur gel d'agarose 1% + BET de produits PCR issus du criblage sur colonies d'*E.coli* transformées par PBI-121 contenant *WAK1/BRI1/HIS6*.

Puits 1/5/7/8 : produits PCR obtenus avec les amorces ABWAK1int1/Rev (995 bp).

Puits 2/6/8 : produits PCR obtenu avec les amorces BRI1int1/Fwd (959 bp).

Puits 4 : pas d'amplicon (insert non présent)

Puits 3 : amplification non spécifique

SL : Smart Ladder.

A.6.2. Transformation des *Agrobacterium tumefaciens*

La transformation d'*A.thaliana* devant se faire par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens*, il a d'abord été indispensable d'effectuer le transfert de PBI-121 contenant l'insert d'intérêt de *E.coli* vers *A.tumefaciens*. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* que nous avons utilisée est la souche LBA4404/VirG. Dans cette souche, *VirG* est constitutivement actif et est porté par un troisième plasmide (travail en système tertiaire). *VirG* favorise l'induction de la transcription d'autres gènes (*Vir*) nécessaires au transfert de l'ADN-T dans le génome de la plante. Il n'est donc pas nécessaire de blesser la plante pour induire la production d'acétosyringone activatrice des protéines *VirA* se trouvant en amont de *VirG* lors de la transformation.

La méthode classique de transformation des *A.tumefasciens* est l'électroporation, méthode consistant à induire la formation de pores dans la membrane de la bactérie, permettant l'entrée du plasmide d'intérêt. L'électroporation de cellules électrocompétentes d'*A.tumefasciens* en présence de PBI-121 (contenant *WAK1/BRI1/HIS6* et ses versions mutées) préalablement isolé par miniprep a été réalisée. La sélection des agrobactéries ayant incorporé le vecteur PBI-121 contenant *WAK1/BRI1/HIS6* a été réalisée sur milieu sélectif (kanamycine).

Un criblage par PCR (Fig.16) sur colonies d'*A. tumefasciens* avec les amorces Reverse/ABWAK1int1 et Forward/BRI1int1 a permis de repérer les colonies ayant incorporé PBI-121 contenant les séquences codant pour le récepteur hybride (idem pour les versions mutées).

Les clones bactériens confirmés positifs par ce criblage ont été séquencés et sélectionnés pour la transformation des fleurs d'*A.thaliana*.

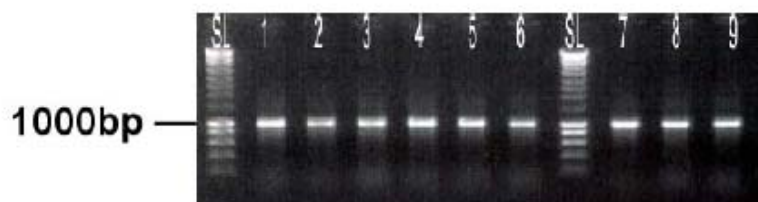


Fig16: : Migration sur gel d'agarose 1% + BET de produits PCR issus du criblage sur colonies d'*A.tumefasciens* transformées par PBI-121 contenant *WAK1/BRI1/HIS6*.

L'amplification avec les amorces ABWAK1int1/Rev montre un fragment d'ADN de 995 bp.

A.6.3.Transformation de fleurs d'*Arabidopsis thaliana*

Cette méthode de transformation a été choisie pour sa facilité et sa bonne efficacité de transformation (1%). Elle consiste en l'immersion de la fleur durant quelques secondes dans une solution de sucre 5% et Tween-20 0,01% où sont resuspendus les *A.tumefasciens* (DO_{600} proche de 0,8) contenant la séquence codant le récepteur hybride. L'efficacité de transformation est optimisée par l'utilisation de surfactant ainsi que de sucre (Clough et Bent, 1998). Selon Desfeux et *al.* (2000), la transformation se ferait de façon privilégiée au niveau des organes femelles.

Les graines d'*A.thaliana* ont été semées en terre individuellement et mise dans des conditions de forte humidité, avec une photopériode de 18 h luminosité/ 6 h obscurité (24°C le jour, 22°C la nuit). Après 15-20 jours, des fleurs prêtes à être transformées (Fig.17) étaient disponibles. La procédure de transformation a été répétée à intervalle de 6 jours pour chaque fleur sur chaque plantule (25 plantules). Durant les 24 h. succédant la transformation, les plantules sont maintenues dans un environnement très humide. L'arrosage des plantes a été stoppé lorsque les siliques commençaient à sécher. Les opérations de transformation accomplies, la récupération des graines a été réalisée à la main, silique par silique.



Fig.17: Transformation des plantules d'*A. thaliana*.

Les plantules transformées sont dirigées dans une boîte afin de récupérer les graines. Chaque fleur transformée est marqué d'un fil coloré. Un code couleur a été établi afin de réaliser des transformations à intervalles de 6 jours sur chaque fleur.

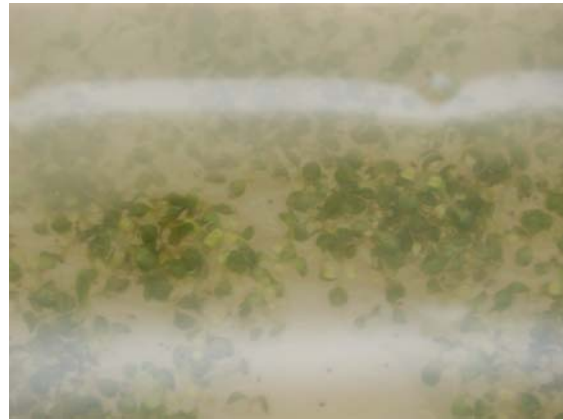
A.6.4. Germination et sélection des plantules d'*A. thaliana* transformées

La germination des graines récoltées et stérilisées a été induite en milieu liquide non sélectif afin de ne pas bloquer l'étape cruciale de germination. Après germination d'un grand nombre de graines (Fig.18A), nous avons opté pour une sélection relativement forte en présence de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de kanamycine sur milieu à deux phases. Un tel milieu est composé à la base d'un milieu sélectif solide (0,8% agar) sur lequel est coulé un milieu semi-solide (0,3% d'agar). Les graines ayant germé ont été récupérées dans le milieu semi-solide et « coulées » sur le milieu solide (Fig.18B).

Après 15 jours de sélection (Fig.18C), les plantules survivantes (et vertes) ont été transférées sur un milieu frais sélectif solide (0,8% agar ; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamycine) (Fig.18D et E). Ces plantules sont toujours en culture à ce stade des manipulations.



A./



B./



C./



D./



E./

Fig.18 : Les différents stades de la sélection des plantules transformées d' *A. thaliana*.

A./ Germination en conditions stériles non sélectives des graines d' *A. thaliana*.

B./ Passage sur milieu sélectif deux phases en conditions stériles des graines ayant germé.

C./ Sélection : mort des plantes n'ayant pas intégré l'ADN-T procurant la résistance à la kanamycine

D./ Repiquage des plantes sélectionnées sur milieu sélectif solide frais.

E./ Plantule en cours de développement sur le milieu sélectif en conditions stériles.

B. Etude de la liaison WAK1/pectine

Pour rappel, WAK1 a la capacité de lier la pectine via son domaine extracellulaire (Kohorn, 2001) (cfr introduction). Decreux et Messiaen (2005) ont montré que WAK1 interagissait avec la pectine et des fragments pectiques en conformation en « boîte à œufs ». Cette interaction est inhibée lorsqu'il y a méthylestérification des fonctions carboxyliques des pectines.

Cette deuxième partie du mémoire vise à poursuivre la caractérisation de la liaison de WAK1 avec les pectines extraites de la paroi de cellules en suspension d'*A.thaliana* écotype *columbia*. Afin d'étudier spécifiquement l'interaction de WAK1 (et non d'une autre isoforme de WAK) avec la pectine, nous avons utilisé la protéine WAK₆₇₋₂₅₄ constituée des acides aminés 67 à 254 de WAK1. WAK₆₇₋₂₅₄ contient les acides aminés impliqués dans la fixation de la pectine (Cfr mutagenèse dirigée au point A.5.1.1).

L'interaction de WAK1 avec la pectine extraite de cellules en suspension âgées de 3 et 7 jours a été mesurée afin de déterminer l'influence du temps de culture sur la liaison WAK1-pectine. En parallèle, une analyse des fractions pectiques avec l'anticorps monoclonal 2F4 (Liners et al., 1989), reconnaissant spécifiquement les pectines en conformation en « boîte à œufs » a été réalisée.

B.1. Préparation de WAK₆₇₋₂₅₄

Un clone levurien contenant le gène codant pour WAK₆₇₋₂₅₄ inséré dans le vecteur pYES2/NT C était disponible au laboratoire (Decreux, thèse de doctorat). La séquence codant WAK₆₇₋₂₅₄ est sous le contrôle d'un promoteur inducible au galactose. WAK₆₇₋₂₅₄ est cloné en phase avec un tag polyhistidine et un épitope Xpress utilisables respectivement pour la purification et la détection de WAK₆₇₋₂₅₄. Ces deux tags sont situés au niveau de

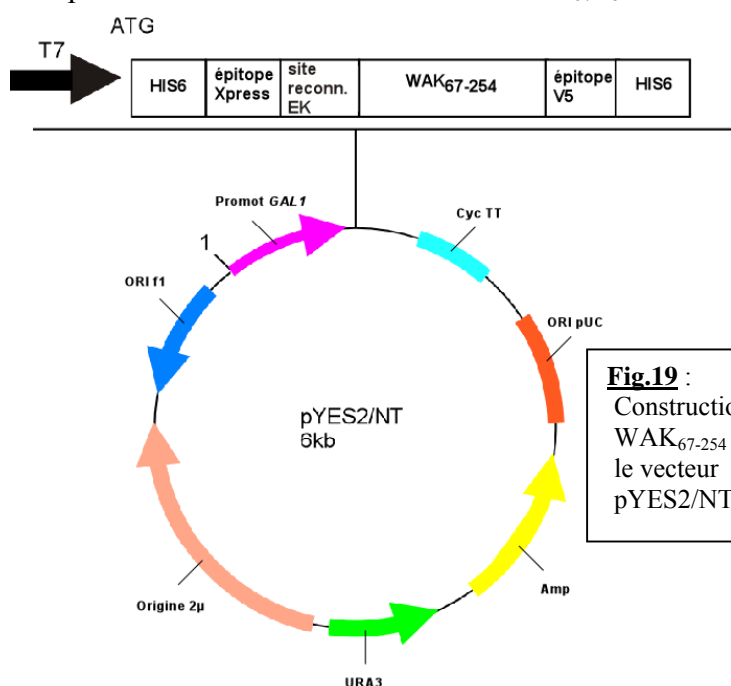


Fig.19 :
Construction
WAK₆₇₋₂₅₄ dans
le vecteur
pYES2/NT C

l'extrémité amino-terminale de la protéine WAK₆₇₋₂₅₄. Le vecteur pYES2/NT C (Fig.19) contenant le gène URA3, une sélection sur milieu sans uracile (milieu SC-U) des levures a été réalisée.

Des précultures de levures en présence de raffinose et des cultures de levures en présence de galactose et raffinose de levures en milieu liquide ont été réalisées afin d'activer le promoteur contrôlant l'expression de WAK₆₇₋₂₅₄. Le culot de levures obtenu après la centrifugation est lavé à

l'eau et re-centrifugé. De ce culot de centrifugation sont extraites les protéines d'intérêt par

broyage sous azote liquide. L'utilisation d'inhibiteurs de protéases durant toutes les étapes relatives à l'extraction protéique (cfr matériel et méthodes) permet la conservation de l'intégrité des protéines extraites. Les protéines WAK₆₇₋₂₅₄ ont été purifiées sur colonne nickel Ni-NTA.

Les différentes fractions éluées de la colonne ont été analysées par SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie (Fig.20). Les fractions 5-7 contiennent la majorité des protéines. On y distingue une protéine de poids moléculaire apparent proche de 25 kDa correspondant probablement à WAK₆₇₋₂₅₄ dont le poids moléculaire théorique est de 27 kDa. On observe également une légère contamination pouvant correspondre à des multimères de WAK₆₇₋₂₅₄ ou à des protéines différentes de WAK₆₇₋₂₅₄.

Un Western blot (Fig.21), nous a permis de confirmer grâce à anticorps anti-Xpress de souris la présence de la protéine WAK₆₇₋₂₅₄ majoritairement dans les fractions 5-7. Ce Western blot permet également de confirmer la présence de multimères de WAK₆₇₋₂₅₄ (non montré).

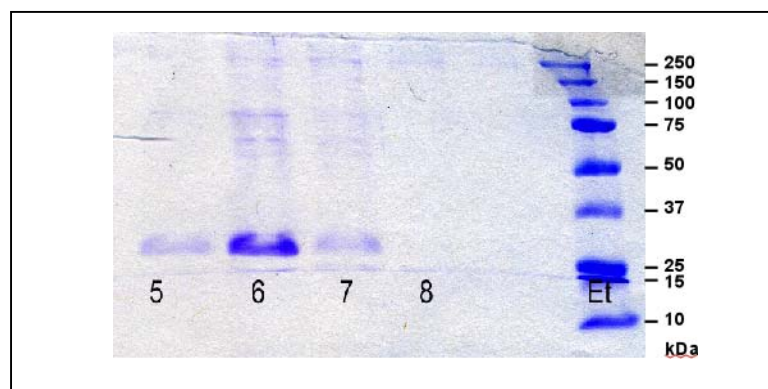


Fig.20 : SDS-PAGE des éluats protéiques après purification sur colonne Ni-NTA et coloration au bleu de Coomassie. La bande à ~25 kDa correspond probablement à WAK₆₇₋₂₅₄. Et: étalon de poids moléculaires ; 5-8 : fractions éluées.

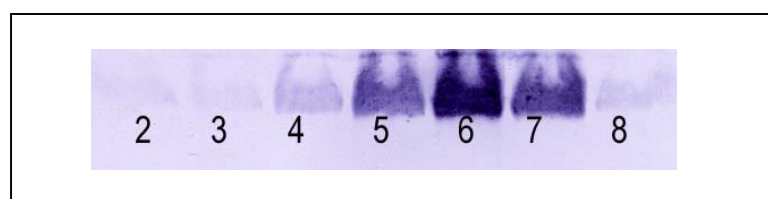


Fig.21: Western-blot des éluats protéiques après purification sur colonne NI-NTA Révélation via l'anticorps anti-Xpress. L'éluat protéique 6 contient une forte concentration de WAK₆₇₋₂₅₄. 2-8 : fractions éluées.

Afin de standardiser les tests ELISAs ultérieurs, les fractions protéiques ont été quantifiées par la méthode Bradford. La concentration de WAK₆₇₋₂₅₄ a ainsi été évaluée à 0,18 mg/ml. Cette concentration a été déterminée en tenant compte de l'équation de la droite de calibration établie avec des étalons BSA ($y=0,91x+0,01$; $R^2=0,99$) et de la dilution des échantillons / étalons BSA.

Les fractions protéiques obtenues ont été dialysées. Cette étape a été effectuée afin d'éliminer principalement l'urée provenant des solutions utilisées pour la purification des fractions protéiques sur colonne nickel. Avant la dialyse des fractions protéiques, du

Triton X-100 a été rajouté aux fractions 5-7 préalablement regroupées, afin d'éviter une précipitation des protéines suite à un mauvais repliement lors de la dialyse.

Dans le but de vérifier l'intégrité et l'aptitude de la protéine WAK₆₇₋₂₅₄ à fixer la pectine, un ELISA non compétitif a été réalisé. Cet ELISA a également permis de déterminer à quelle dilution les protéines WAK₆₇₋₂₅₄ devaient être utilisées pour les tests ultérieurs d'interaction entre WAK₆₇₋₂₅₄ et la pectine. Pour cette expérimentation, des PGAs (acide polygalacturoniques ; 20 µg/puits) ont été attachés au fond des puits. Des concentrations différentes en WAK₆₇₋₂₅₄ ont ensuite été ajoutées. La révélation a été faite par l'intermédiaire d'un anticorps primaire anti-Xpress reconnu par un anticorps secondaire couplé à la HRP (Horseradish peroxydase).

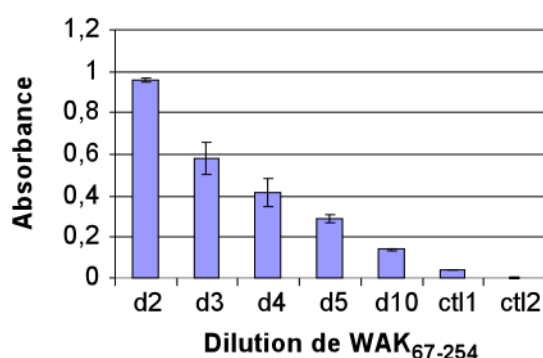


Fig.22: ELISA non compétitive : détection de WAK₆₇₋₂₅₄ par l'anticorps anti-Xpress.
d=dilution ; ctl1=pas de protéine ; ctl2=ni protéine ni tampon.

Une interaction entre PGAs et WAK₆₇₋₂₅₄ est mise en évidence même lorsque WAK₆₇₋₂₅₄ est dilué 10 fois (Fig.22). Le niveau de saturation de la mesure de l'absorbance par le lecteur de plaque ELISA étant de 3, nous avons choisi de réaliser les tests ultérieurs avec WAK₆₇₋₂₅₄ dilué deux fois.

B.2. Isolement de fractions pectiques de cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana*

Quatre fractions pectiques de cellules en suspension d'*A.thaliana* écotype *columbia* âgées de trois et sept jours ont été extraites selon un protocole mis au point par Thibault (1986). Les quatre fractions pectiques extraites sont (cfr. Matériel et méthodes):

WSP : extraction à l'eau des pectines faiblement liées.

OXP : extraction à l'oxalate d'ammonium (agent chélatant) des pectines liées au calcium.

HP : extraction à l'acide chlorhydrique chaud des pectines fortement liées.

OHP : extraction au NaOH des pectines résiduelles.

Afin de standardiser les tests d'interaction ultérieurs, les différentes fractions pectiques ont été quantifiées.

B.2.1. Dosage des sucres totaux dans les fractions pectiques (FP)

Dans un test préliminaire, une évaluation non quantitative des sucres totaux au sein des fractions pectiques a été réalisée par dot sur plaque de silice et révélation par hydrolyse à l' H_2SO_4 10% en éthanol (Fig.23A). La majorité des sucres semble présente dans les fractions pectiques extraites à l'acide chlorhydrique (HP), ce qui est en correspondance avec les résultats obtenus par Dinu (2001). Par comparaison avec le « test étalon » (Fig.23B) effectué avec des concentrations déterminées de glucose (0 à 60 $\mu\text{g/ml}$), la concentration de sucres dans WSP serait légèrement supérieure à 60 $\mu\text{g/ml}$. Celle de HP, hors échelle, est par conséquent non évaluable. Les quantités de sucres dans les fractions pectiques extraites à l'oxalate d'ammonium (OXP) et au NaOH (OHP) sont proches de 60 $\mu\text{g/ml}$.

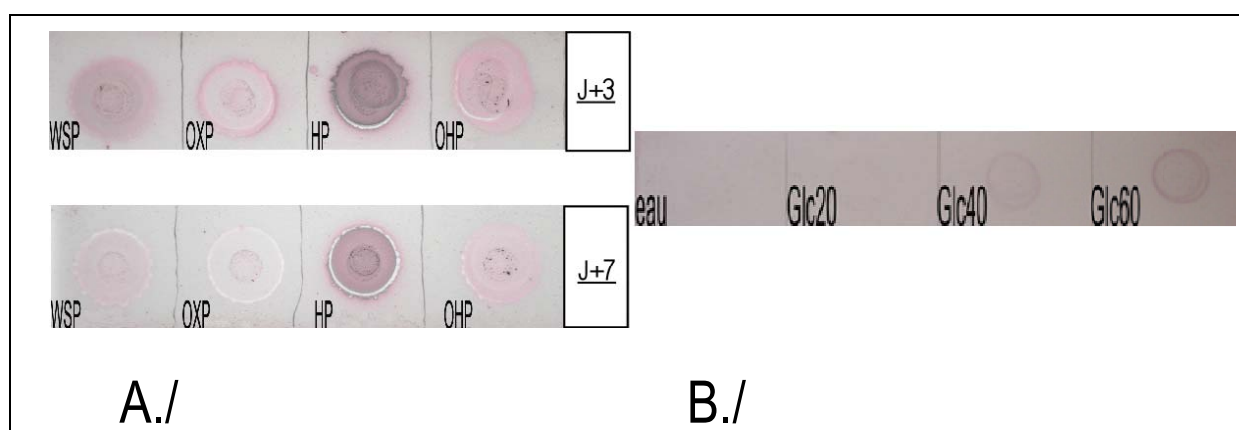


Fig.23 : Dosage des sucres totaux par dot sur plaque de silice.

A./ La plaque du haut concerne les cellules en suspension âgées de 3 jours, celle du bas, les cellules en suspension âgées de 7 jours. De gauche à droite : fractions pectiques extraites à l'eau (WSP), à l'oxalate d'ammonium (OXP), à l'acide chlorhydrique (HP), au NaOH (OHP).

B./ Etalon. De gauche à droite : eau, glucose 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$.

B.2.2. Dosage des acides uroniques dans les fractions pectiques

Dans une étape ultérieure, nous avons dosé les acides uroniques des différentes fractions pectiques par la méthode au métahydroxybiphényle (MHBP). Malgré l'obtention de droites de calibration correctes (Cfr. « Matériel et méthodes »), nous n'avons pas détecté d'acides uroniques au sein des fractions pectiques. Nous avons opté pour une technique plus sensible : l'HPLC sur une colonne CarboPac PA 100 (billes entourées d'une pellicule de NH_3^+) avec une détection PAD (Pulse Amperometry Detection).

Le tableau ci-dessous reprend les résultats de quantification des différentes fractions pectiques obtenues.

	WSP ($\mu\text{g/ml}$)	OXP ($\mu\text{g/ml}$)	HP ($\mu\text{g/ml}$)	OHP ($\mu\text{g/ml}$)
J+3	9,10	0,96	1,97	1,28
J+7	2,45	Non déterminé	1,00	Non déterminé

Résultats de dosages HPLC des fractions pectiques issues de cellules en suspension âgées de 3 jours (j+3) et 7 jours (j+7).

Nous constatons que les acides uroniques sont en concentrations relativement faibles au sein des diverses fractions pectiques. La fraction pectique extraite à l'eau contient la majorité des pectines.

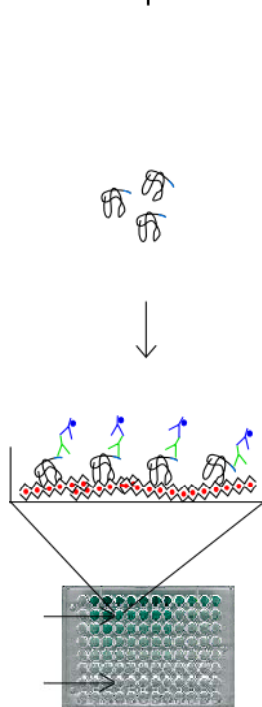
Les protéines et les différentes FP étant disponibles et purifiées, les tests d'interaction WAK1-pectine ont été réalisés par ELISAs compétitifs. Chaque fraction pectique a été testée en condition native et après dé-estérification au NaOH. Le traitement au NaOH permet de dé-estérifier chimiquement les pectines et de faire apparaître des zones susceptibles d'adopter une conformation en « boîte à œufs ».

B.3. Principe de l'ELISA compétitif

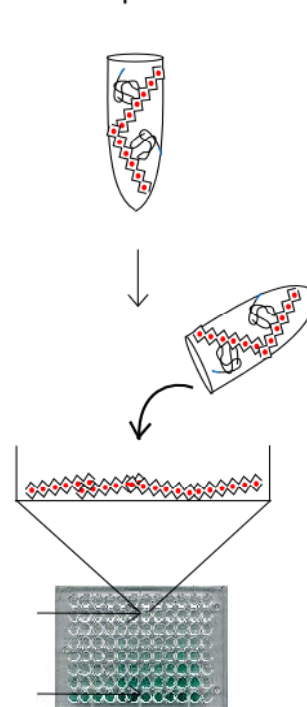
B.3.1. ELISA compétitif avec la protéine WAK₆₇₋₂₅₄

Ce test permet de déterminer s'il y a liaison entre le domaine extracellulaire de WAK1 et les fractions pectiques extraites (Fig. 24). Préalablement au test, WAK₆₇₋₂₅₄ et FP (WSP, OXP, HP, OHP) sont mis à incuber pendant une heure. Le mélange est ensuite déposé dans les puits de la plaque ELISA au fond desquels sont attachés 20 µg de PGAs commerciaux pouvant lier WAK₆₇₋₂₅₄. Une saturation par de la poudre de lait est effectuée suite au dépôt de la préparation « WAK₆₇₋₂₅₄-FP » dans les puits. Une absence d'interaction entre WAK₆₇₋₂₅₄ et FP favorise la liaison de WAK₆₇₋₂₅₄ aux PGAs se trouvant au fond des puits. La présence de WAK₆₇₋₂₅₄ au fond des puits est détectée au moyen d'un anticorps anti-Xpress. Dans le cas d'une interaction entre WAK₆₇₋₂₅₄ et FP, ceux-ci forment un complexe qui est éliminé lors de lavages successifs et WAK₆₇₋₂₅₄ ne peut pas interagir avec les PGAs au fond des puits. Une valeur d'absorbance élevée signifie une absence d'interaction entre WAK₆₇₋₂₅₄ et FP en solution. Une absorbance faible ou nulle signifie qu'il y a interaction entre WAK₆₇₋₂₅₄ et FP en solution.

Non compétition



Compétition



PGAs



WAK₆₇₋₂₅₄



Anticorps primaire anti-Xpress



Anticorps secondaire anti-souris
couplé à la HRP

Fig.24: Principe de l'ELISA compétitif..

B.3.2. ELISA compétitif avec l'anticorps monoclonal 2F4 (Liners et al., 1989 et 1992)

Ce test permet de vérifier la présence de pectines en conformation en « boîte à œufs » dans les fractions pectiques extraites. Le principe et le protocole sont exactement les mêmes que pour le test avec WAK₆₇₋₂₅₄ sauf que l'anticorps 2F4 remplace WAK₆₇₋₂₅₄. En cas d'interaction du 2F4 avec FP, c'est à dire si des pectines en conformation en « boîte à œufs » sont présentes dans les fractions pectiques, le complexe ainsi formé est éliminé lors de lavages successifs et le 2F4 ne peut pas réagir avec les PGAs au fond des puits. La valeur d'absorbance mesurée lors de la révélation sera faible. Dans le cas inverse, c'est-à-dire si les fractions pectiques ne contiennent pas de pectines en conformation en « boîte à œufs », le 2F4 se lie aux PGAs au fond des puits et l'absorbance mesurée sera importante.

B.3.3. Contrôles

Deux contrôles d'interaction ont été effectués. Le premier consiste à réaliser l'ELISA compétitif avec des acides polygalacturoniques (PGA) commerciaux à une concentration de 50 µg/ml.

Le second contrôle, consiste en un test en absence de compétiteurs. Les protéines WAK₆₇₋₂₅₄ (ou bien l'anticorps 2F4) se fixent directement sur les PGAs (20 µg/ puits) au fond des puits. Ce contrôle positif donne une coloration maximale qui représentera arbitrairement une valeur de 100%.

Tous les tests ont été réalisés en triplicat. Deux ELISAs compétitifs indépendants ont été réalisés pour chaque test.

B.3.4. Etablissement d'une courbe de compétition en présence de pectines commerciales

Ce test permet, d'une part, de confirmer l'intégrité de la protéine WAK₆₇₋₂₅₄, et d'autre part d'évaluer la concentration minimale en pectines requise pour qu'il y ait une réelle compétition de la liaison de WAK₆₇₋₂₅₄ entre celles-ci et les PGAs accrochés au fond des puits de la plaque ELISA. Pour ce faire, un ELISA compétitif avec des PGAs (acides homopolysaccharidiques) commerciaux, donc de concentration connue, a été réalisé en présence d'une concentration constante de la protéine WAK₆₇₋₂₅₄ (1,5µg). La concentration de PGAs fixés au fond des puits de la plaque ELISA était également invariable (20µg/ml). Le contrôle (« non compétition ») consistait à déposer WAK₆₇₋₂₅₄ seul. La fourchette de concentrations en PGAs en solution testée s'étendait de 300 à 0,02 µg/ml.

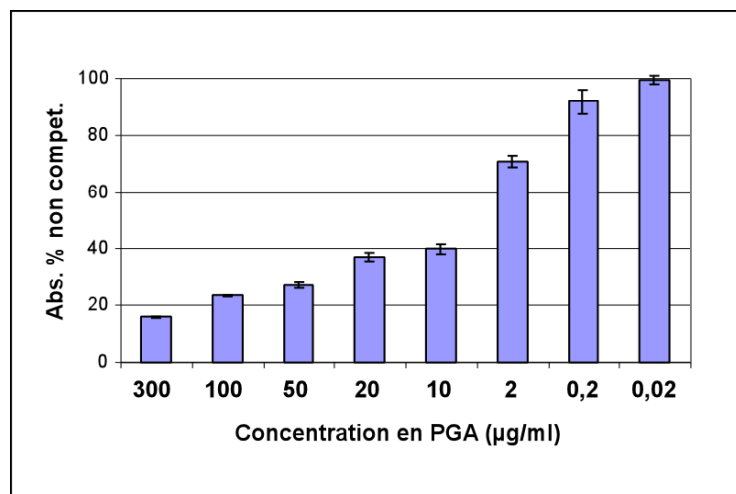


Fig.25: Courbe de compétition entre WAK₆₇₋₂₅₄ (concentration constante) et des PGAs (concentrations variables). La concentration minimale en pectine libre pour que la compétition soit effective comprise entre 0,2 et 0,02 µg/ml de matériel pectique.

Les résultats présentés à la figure 25 montrent qu'il n'y a plus de compétition à partir d'une concentration en PGAs en solution comprise entre 0,2 et 0,02 µg/ml. On peut donc considérer que la détection d'une compétition est illusoire pour des concentrations inférieures à 0,2 µg/ml. Ces résultats concordent avec ceux de Decreux et Messiaen (2005), indiquant que la protéine utilisée pour faire le test est intègre.

B.3.5. Résultats des ELISAs compétitives en présence des pectines extraites des parois d'*A. thaliana*

Avant d'entamer la description des résultats, rappelons tout d'abord que nous avons déterminé que nos fractions pectiques étaient faiblement concentrées en acides uroniques (de 0,96 à 9,10 µg/ml, voir tableau paragraphe B.2.2). Les dilutions préliminaires nécessaires à l'utilisation de ces fractions en ELISA (notamment dû à l'étape de dé-estérification) nous ont obligé à travailler avec des concentrations allant de 0,45 µg/ml à 0,05 µg/ml (Fig.26.5 et 26.6). Tandis que la plupart des fractions présentaient une concentration à la limite du seuil de détection défini entre 0,2 et 0,02 µg/ml de pectines pures, nous avons tout de même effectué le test ELISA pour chacune des FP. Seule la fraction WSP extraite à partir de cellules en suspension de 3 jours devait permettre l'interaction ou la reconnaissance de la protéine WAK₆₇₋₂₅₄.

B.3.5.1. Résultats de l'ELISA compétitif avec WAK₆₇₋₂₅₄ et FP

Un test ELISA compétitif a été réalisé comme précédemment décrit en utilisant 1,5 µg de protéines et les FP en concentrations variables. Les résultats sont présentés en pourcentage de la réponse sans compétition (Fig.26.1-4). Les pectines extraites à l'eau (WSP) à partir de cellules en suspension âgées de trois jours semblent interagir avec WAK₆₇₋₂₅₄ puisqu'une diminution de 20% de la réponse est détectée par rapport à l'échantillon sans compétition. (Fig. 26.1). Suite à la dé-estérification de cette fraction pectique, une augmentation de l'interaction de la protéine WAK₆₇₋₂₅₄ est observée (diminution de la réponse de 40 %). Ces résultats nous permettent de déduire que cette fraction pectique est en partie estérifiée. En se référant à la courbe de compétition, la concentration de 0,45 µg/ml de la fraction WSP devait nous permettre d'obtenir au maximum 10 % de diminution de la réponse par rapport au contrôle sans compétition. Les 40 % obtenus (Fig.26.1) semblent étonnants.

De manière surprenante, nous observons que les autres fractions pectiques, bien que peu concentrées, sont également compétitrices dans notre test ELISA (Fig.26.1-4). Ainsi, nous obtenons des diminutions de détection par rapport au test sans compétition allant de 20 à 60 %.

Ces résultats sont discordants par rapport à la courbe de compétition réalisée avec des pectines pures et nous suspectons que des interactions/compétitions non spécifiques pourraient provenir d'un contaminant empêchant la liaison de WAK₆₇₋₂₅₄ aux PGAs accrochés au fond des puits (« effet de matrice »).

Etant donné que les résultats de la courbe de compétition (B.3.4) sont en accord avec ceux obtenus par Decreux et Messiaen (2005), l'hypothèse d'un problème au niveau de la protéine WAK₆₇₋₂₅₄ ne peut pas être envisagée.

Comme nos concentrations en acides uroniques au sein des fractions pectiques étaient plus faibles que celles utilisées dans la littérature (15 µg/ml ; Decreux et Messiaen, 2005), une

concentration sous vide de ces fractions pectiques a été réalisée. Suite à cette étape de concentration, des précipités ont été observés dans les fractions OXP correspondant probablement à des cristaux d'oxalate d'ammonium. Afin que ceux-ci ne perturbent pas les tests ELISAs compétitifs, une dialyse des fractions pectiques a été effectuée. Les ELISAs compétitifs réalisés avec ces fractions pectiques ont donné des résultats identiques aux précédents.

B.3.5.2. Résultats de l'ELISA compétitif avec l'anticorps 2F4 et les FP

Un test ELISA compétitif a été réalisé comme précédemment décrit en utilisant le 2F4 en compétition avec des concentrations variables en FP. Les résultats sont présentés en pourcentage de la réponse sans compétition (Fig.26.1-4). Pour rappel, l'anticorps 2F4 est capable de reconnaître des pectines adoptant la conformation en « boîte à oeufs ».

Pour la fraction WSP en provenance de cellules en suspension de trois jours, nous ne détectons pas de diminution de l'interaction du 2F4 avec les pectines immobilisées au fond des puits, suggérant que cette fraction ne contient pas ou peu de pectines en conformation en « boîte à œufs » (Fig.26.1). Suite à la dé-estérification de cette fraction pectique, une diminution de la réponse suggère que cette fraction est en partie estérifiée. Ces résultats sont en partie discordants avec ceux obtenus avec la protéine WAK₆₇₋₂₅₄. En effet, la fraction WSP de cellules en suspension de trois jours non dé-estérifiée étant compétitrice envers les protéines WAK₆₇₋₂₅₄, aurait dû l'être également envers le 2F4. Rappelons que des travaux antérieurs ont démontré que WAK₆₇₋₂₅₄ et l'anticorps 2F4 reconnaissent des pectines relativement semblables dans des conditions similaires (Decreux et Messiaen, 2005).

Les autres fractions pectiques, bien que moins concentrées, semblent être fortement compétitrices sans étape de dé-estérification préalable. Ces nombreuses discordances nous ont également fait suspecter dans ce cas que des contaminants pourraient empêcher la liaison du 2F4 aux PGAs du fond des puits.

Les résultats obtenus en ELISA compétitif en présence de WAK₆₇₋₂₅₄ et du 2F4 sont peu interprétables.

L'hypothèse d'un contaminant salin est peu probable puisque les fractions pectiques et protéiques ont été dialysées. Les résultats obtenus en dot sur silice (Fig.23) nous permettent de supposer qu'une contamination de nature polysaccharidique, excepté pour HP (forte quantité de sucres détectés), est peu probable.

L'hypothèse d'un contaminant provoquant « l'effet de matrice » pourrait provenir du processus d'extraction. En effet, lors des étapes d'extractions, des particules floconneuses restaient en suspension et n'étaient pas « culotables » dans les conditions de centrifugations préconisées par le protocole de Thibault *et al.* (1986).

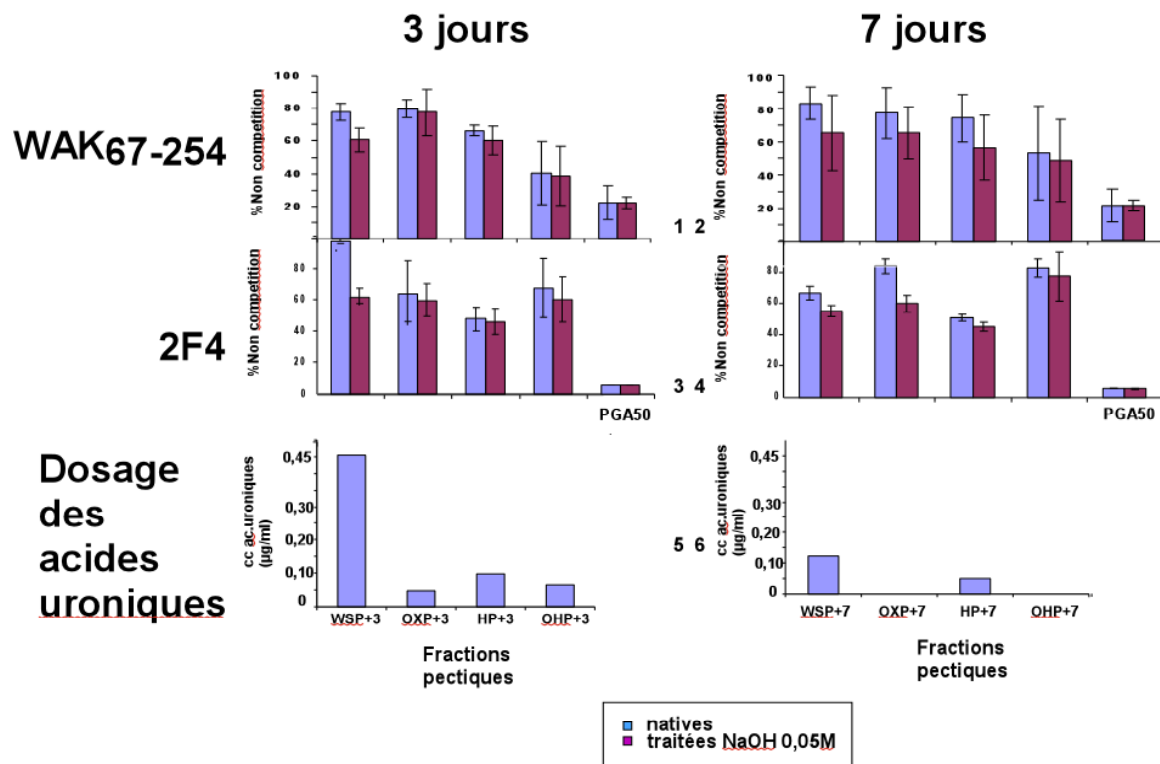


Fig.26 : Résultats des ELISAs compétitifs. Les acteurs sont des PGAs accrochés au fond des puits, des fractions pectiques (WSP, OXP, HP, OHP) de cellules en suspension d'*A.thaliana* de 3 ou 7 jours et soit la protéine recombinante WAK₆₇₋₂₅₄ soit l'anticorps monoclonal 2F4. Les tests ont été réalisés avec des fractions pectiques natives et dé-estérifiées. En 5 et 6 sont représentés les concentrations, suivant un dosage HPLC, des acides uroniques.

CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES

De par sa localisation membranaire et son contact intime avec la paroi, le récepteur kinase WAK1 constitue un sérieux candidat dans la communication extracellulaire de la cellule végétale. Un des ligands de WAK1 est la pectine, un des composants majeur de la paroi cellulaire et source d'éliciteurs de multiples réponses physiologiques, telles que la défense envers les pathogènes ou l'élongation cellulaire. Le(s) récepteur(s) membranaire(s) des éliciteurs pectiques n'a (ont) pas encore été identifié(s).

L'objectif de ce mémoire était d'amener une contribution à l'étude de l'interaction entre WAK1 et la pectine qui permettrait de prouver que WAK1 est le récepteur des pectines et d'oligosaccharides dérivés de la pectine. Le concept du récepteur hybride a été exploité dans ce travail.

Au terme de la première partie de ce mémoire, nous avons une construction encodant un récepteur hybride *WAK1-BRI1* auquel un tag polyhistidine a été ajouté. Cette nouvelle construction a été introduite dans le génome d'*A. thaliana* par transformation via *Agrobacterium tumefaciens* et la technique de l'immersion florale. Nous avons obtenus des plantules potentiellement transformées qui sont maintenues actuellement en culture.

Au départ de la construction précédente, nous avons également obtenu des versions mutées, soit au niveau du domaine extracellulaire de WAK1, soit au niveau du domaine intracellulaire de BRI1. Les premiers mutants devraient empêcher la fixation de la pectine sur WAK1 ; les seconds, produire une kinase inactive incapable d'initier une cascade transductionnelle dépendante de BRI1. Les versions mutées du récepteur hybride sont, au terme de ce mémoire, prêtes à être insérées dans le génome de plante.

La première étape à franchir avant l'étude du récepteur hybride lui-même serait de vérifier par PCR la présence de la séquence codant *WAK1/BRI1/HIS6* au sein du génome d'*A. thaliana*. Il serait également intéressant de déterminer par « Genome Walker » si l'ADN-T contenant la séquence codant le récepteur hybride s'est intégré au niveau d'un gène capital pour la plante. Parallèlement, le nombre d'insertions au sein du génome d'*A. thaliana* pourrait être déterminé via « Southern blot ».

Il faudra également veiller à obtenir des lignées homozygotes pour le caractère *WAK1/BRI1/HIS6* introduit. Cette étape ne devrait pas poser trop de problèmes étant donné que les *A. thaliana* s'autofécondent très facilement. Une PCR avec des amorces situées au niveau de séquences du végétal bordant le récepteur hybride devrait permettre de confirmer l'état homozygote des plantes transgéniques.

Il faudra ensuite étudier la transcription et le niveau d'expression du récepteur hybride. Pour ce faire, des RT-PCR semi-quantitatives ou quantitatives permettront d'évaluer le niveau de transcription des ARN_m *WAK1/BRI1/HIS6*. Des Western blot de protéines membranaires extraites des plantes transformées permettront, grâce à la présence du tag polyhistidine, de vérifier la localisation membranaire du récepteur hybride.

A plus long terme, il s'agira de vérifier la capacité de ce récepteur hybride à fixer, via son domaine extracellulaire WAK1, les pectines ou des fragments de pectines, et à activer la voie de transduction du signal spécifique de BRI1 dans des plantules d'*A. thaliana* cultivées en milieu liquide. Pour ce faire, les taux de transcription des gènes *CYCD3*, *BRH1* et *TCH4*, spécifiques de la voie BRI1, seront mesurés par RT-PCR. En présence de pectine, le récepteur hybride devrait aboutir à une augmentation de la transcription des gènes *CYCD3* et

TCH4, et à une diminution de la transcription du gène *BRH1*. Des contrôles en présence de plantes non transformées et en présence de plantes transformées avec les versions mutées du récepteur hybride permettront de confirmer le rôle signalétique du récepteur hybride et du récepteur WAK1 par extension.

Une fois la fonction de signalisation du domaine extracellulaire de WAK1 démontrée, il sera alors nécessaire d'identifier des interactants cytoplasmiques du domaine kinase de WAK1. Un criblage double hybride en levure avec le domaine kinase de WAK1 d'une banque d'*A.thaliana* permettrait de trouver une ou plusieurs protéines se liant spécifiquement au domaine intracellulaire de WAK1. Enfin, via un test d'activité en présence d'ATP marqué au ³²P, il serait possible de déterminer si WAK1 phosphoryle ces protéines-candidates ou si celles-ci ne sont que des protéines « adaptatrices ».

Au terme de la seconde partie de ce mémoire, nous avons étudié l'interaction entre le domaine extracellulaire de *WAK1* et la pectine. Une protéine recombinante nommée *WAK*₆₇₋₂₅₄ et comprenant les acides aminés 67 à 254 de *WAK1* a été produite et purifiée. Des fractions pectiques de cellules en suspension (*A. thaliana* écotype *columbia* âgées de trois et sept jours) ont également été extraites. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de tirer une conclusion claire concernant leur interaction. Il serait nécessaire de réaliser de nouveaux tests d'interaction avec une concentration plus importante en fractions pectiques.

Des tests d'interaction entre *WAK1* et des pectines extraites de plantules d'*A. thaliana* ont également été réalisés mais n'ont pu aboutir par manque de matériel pectique. Il serait nécessaire de refaire cette expérimentation avec des quantités de matériel végétal plus importantes. La détermination du niveau d'estérification de pectines (et donc leur liaison à *WAK1*) au sein des plantules pourrait donc être comparé à celui de cellules en suspension.

BIBLIOGRAPHIE

- Altamura, M.M., Zaghi, D.Z., Salvi, G., DeLorenzo, G., Bellincampi, D., Oligogalacturonides stimulate pericycle cell wall thickening and cell divisions leading to stoma formation in tobacco leaf explants. *Planta*, **204**, 429-436 (1998).
- Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815 (2000).
- Anderson, C.M., Wagner, T.A., Perret, M., He, Z.H., He D., Kohorn B.D., WAKs : cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant molecular biology*, **47**, 197-206 (2001).
- Baluska F., Samaj, J., Wojtaszek P., Volkmann, D., Menzel D., Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant physiology*, **133**, 482-491 (2003).
- Bariola, P.A., Retelska, D., Stasiak, A., Kammerer, R.A., Fleming, A., Hijri, M. Frank, S., Farmer, E.E., Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plant. *Plant molecular biology*, **55**, 579-594 (2004).
- Becraft, P.W., Receptor kinases in plant development. *Trends in plant science*, **3**, 384-388 (1998).
- Becraft P.W., Receptor kinase signaling in plant development. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **18**, 163-192 (2002).
- Bell, J.K., Mullen G.E.D., Leifer C.A., Mazzoni, A., Davies D.R., Segal, D.M., Leucine-rich repeats and pathogen recognition in toll-like receptors. *Trends in immunology*, **24**, 528-533 (2003).
- Bellincampi, D., Dipierro, N., Salvi, G., Cervone, F., DeLorenzo, G., Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant physiology*, **122**, 1379-1385 (2000).
- Bellincampi, D., Salvi, G., DeLorenzo, G., Cervone, F., Marfa, V., Eberhard, S., Darvill, A., Albersheim, P., Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. *Plant journal*, **4**, 207-213 (1993).
- Bellincampi, D., Cardarelli, M., Zaghi, D., Serino, G., Salvi, G., Gatz, C., Cervone, F., Altamura, M.M., Costantino, P., DeLorenzo, G., Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in rolB-transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the rolB gene. *Plant cell*, **8**, 477-487 (1996).
- Binet, M.N., Bourque, S., Lebrun-Garcia, A., Chiltz, A., Pugin, A., Comparison of the effects of cryptogin and oligogalacturonides on tobacco cells and evidence of different forms of desensitization induced by these elicitors. *Plant science*, **137**, 33-41 (1998).
- Bishop, G. J. & Koncz, C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell* **14**, S97-S110 (2002).
- Bolwell, G.P., Dalessandro, G., Northcote, D.H., Decrease of polygalacturonic acid synthase during xylem differentiation in sycamore, *Phytochemistry*, **24**, 699-702 (1985).
- Borner, G.H.H., Sherrier, D.J., Stevens, T.J., Arkin, I.T., Dupree, P., Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A genomic analysis. *Plant physiology*, **129**, 486-499 (2002).
- Brummell, D.A., Catala, C., Lashbrook, C.C., Bennett, A.B., A membrane-anchored E-type endo-1,4- β -glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **94**, 4794-4799 (1997).
- Brummell, D.A., Harpster, M.H., Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant molecular biology*, **47**, 311-340 (2001).
- Campbell, A.D., Labavitch, J.M., Induction and regulation of ethylene biosynthesis and ripening by pectic oligomers in tomato pericarp discs, *Plant physiology*, **97**, 706-713 (1991).
- Canut, H., Carrasco, A., Galaud, J.P., Cassan, C., Bouyssou, H., Vita, N., Ferrara, P., Pont-Lezica, R., High affinity RGD-binding sites at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* links the cell wall. *Plant journal*, **16**, 63-71 (1998).
- Carpita, N., McCann, M., The cell wall. In : *Biochemistry and molecular biology of plants*, 52-108, edited by Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000).
- Carpita, N., Tierney, M., Campbell, M., Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant molecular biology*, **47**, 1-5 (2001).
- Carpita, N., Gibeau, D.M., Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The plant journal*, **3**, 1-30 (1993).
- Chen, P.Y., Wang, C.K., Soong, S.C., To, K.Y., Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular breeding*, 287-293 (2003).
- Clark, G.B., Thompson Jr, G., Roux, S.J., Signal transduction mechanisms in plants : an overview. *Current science*, **80**, 170-177 (2001).
- Clough, S.J., Bent, A.F., Floral dip : a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant journal*, **16**, 735-743 (1998).
- Clouse S.D., Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Molecular cell*, **10**, 973-982 (2002).
- Cock, J.M., Vanoosthuyse, V., Gaude, T., Receptor kinase signalling in plants and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 230-236 (2002).
- Cosgrove, D.J., Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 171-201 (1997).
- Cosgrove, D.J., Cell wall loosening by expansin. *Plant physiology*, **118**, 333-339 (1998).
- Cosgrove, D.J., Plant cell walls : wall-associated kinases and cell expansion. *Current biology*, **11**, R558-559 (2001).
- Cosgrove, D.J., Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant physiology*, **125**, 131-134 (2001).
- Côté, F., Hahn, M.G., Oligosaccharins : structure and signal transduction. *Plant molecular biology*, **12**, 1379-1411 (1994).
- Côté, F., Ham, K.S., Hahn, M.G., Bergman, C.W., Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions : generation, perception, and signal transduction. In : Biswas, B.B., Das, H. (Eds.), *Subcellular biochemistry*, vol. 29, Plant microbe interactions. New-York, Plenum Press, 385-431 (1998).
- Davis, K.R., Hahlbrock, K., Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant physiology*, **85**, 1286-1290 (1987).
- Decreux, A., Messiaen, J., Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant Cell Physiol.*, **46**, 268-278 (2005).
- Dedhar, S., Hannigan, G.E., Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Current opinion in cell biology*, **8**, 657-669 (1996).
- Deeks, M.J., Hussey, P.J., Davies, B., Formins : intermediates in signal-transduction cascades that affect cytoskeletal reorganization. *Trends in plant science*, **7**, 492-497 (2002).
- Delmer, D.P., Cellulose biosynthesis : exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 245-276 (1999).
- Desfeux, C., Clough, S.J., Bent, A.F., Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant physiology*, **123**, 895-904 (2000).
- Dievart, A., Clark, S.E., Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinase. *Current opinion in plant biology*, **6**, 507-516 (2003).
- Dinu, D., Extraction and characterization of pectins from wheat bran. *Roum. Biotechnol. Lett.* **6**, 37-43 (2001).
- Du, H., Simpson, R. J., Clarke, A. E. & Bacic, A. Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana glauca*. *Plant Journal* **9**, 313-323 (1996).

- Ellis, J., Dodds, P., Prior, T., Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current opinion in plant biology*, **3**, 278-284 (2000).
- Espinosa, A., Alfano, J.R., Disabling surveillance : bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cellular microbiology*, **6**, 1027-1040 (2004).
- Faik, A., Labouré, A.M., Gulino, D., Mandaron, P., Falconet, D., A plant surface protein sharing structural properties with animal integrins. *European journal of biochemistry*, **253**, 552-559 (1998).
- Fares, K., Renard, C.M.G.C., R'zina, Q., Thibault, J.F., Extraction and composition of pectins and hemicelluloses of cell walls of sugar beet roots grown in Morocco. *Intern. J. Food Sc. and technol.*, **36**, 35-46 (2001).
- Fry, S. C., Polysaccharide-Modifying Enzymes in the Plant-Cell Wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 497-520(1995).
- Gamble, R.L., Coonfield, M.L., Schaller, G.E., Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, **95**, 7825-7829 (1998).
- Gao, M., Showalter, A.M., Yeric reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant journal*, **19**, 321-331 (1999).
- Gelvin, S.B., Agrobacterium-mediated plant transformation : the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, **67**, 16-37 (2003).
- Giancotti, F.G., Ruoslahti, E., Integrin signaling. *Science*, **285**, 1028-1032 (1999).
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z. & Boller, T. Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1155-1163 (2001).
- Gomez-Gomez, L. Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular Immunology* **41**, 1055-1062 (2004).
- Guo, H., Ecker, J.R., The ethylene signaling pathway : new insights. *Current opinion in plant biology*, **7**, 40-49, (2004).
- Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K., Schmelzer, E., Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc. Natl. Ac. Sci.USA*, **95**, 8398-8403 (1998).
- Haecker, A., Laux, T., Cell-cell signaling in the shoot meristem. *Current opinion in plant biology*, **4**, 441-446 (2001).
- Haffani, Y.Z., Silva, N.F., Goring D.R., Receptor kinase signalling in plants. *Canadian journal of botany*, **82**, 1-15 (2004).
- Hamel, F., Breton, C. & Houde, M. Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. *Planta* **205**, 531-538 (1998).
- Hardie, D.G., Plant protein serine/threonine kinases : classification and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 97-131 (1999).
- He, Z., Wang, Z.Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., Chory, J., Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1, *Science*, **288**, 2360-2363 (2000).
- He, Z.H., Fujiki, M., Kohorn, B.D., A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *Journal of biological chemistry*, **271**, 19789-19793 (1996).
- He, Z.H., Fujiki, M., Kohorn, B.D., A cluster of five cell wall-associated kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. *Plant molecular biology*, **39**, 1189-1196 (1999).
- He, Z.H., He, D., Kohorn, B.D., Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant journal*, **14**, 55-63 (1998).
- Hee Nam, K., Li, J., BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, **10**, 203-212 (2002).
- Herve, C., Dabos, P., Galaud, J. P., Rouge, P. & Lescure, B. Characterization of an Arabidopsis thaliana gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with an extracellular lectin-like domain. *J Mol Biol* **258**, 778-88 (1996).
- Herve, C., Serres, J., Dabos, P., Canut, H., Barre, A., Rouge, P. & Lescure, B. Characterization of the Arabidopsis lecRK-a genes: members of a superfamily encoding putative receptors with an extracellular domain homologous to legume lectins. *Plant Mol Biol* **39**, 671-82 (1999).
- Hiscock, S.J., McInnis, S.M., Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response : Brassica and beyond. *Trends in plant science*, **8**, 606-613 (2003).
- Horn, M.A., Heinsteins, P.F., Low, P.S., Receptor-mediated endocytosis in plant cells. *Plant cell*, **1**, 1003-1009 (1989).
- Hu, Y., Bao, F., Li, J., Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. *Plant journal*, **24**, 693-701 (2000).
- Huang, Y., Li, H., Hutchinson, C.E., Laskey, J., Kieber, J.J., Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant journal*, **33**, 221-233 (2003).
- Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).
- Ishii, T., Matsunaga, T. & Hayashi, N. Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. *Plant Physiol* **126**, 1698-705 (2001).
- José-Estanyol, M., Puigdomènech, P., Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiol. Biochem.*, **38**, 97-108 (2000).
- Kachroo, A., Nasrallah, M. E. & Nasrallah, J. B. Self-incompatibility in the Brassicaceae: receptor-ligand signaling and cell-to-cell communication. *Plant Cell* **14 Suppl**, S227-38 (2002).
- Kohorn, B.D., Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant physiology*, **124**, 31-38 (2000).
- Kohorn, B.D., Shuffling the deck : plant signalling plays a club. *Trends in cell biology*, **9**, 381-383 (1999).
- Kohorn, B.D., WAKs : cell wall associated kinases : Commentary. *Current opinion in cell biology*, **13**, 529-533 (2001).
- Kopp, E., Medzhitov, R., The toll-receptor family and control of innate immunity. *Current opinion in immunology*, **11**, 13-18 (1999).
- Labra, M., Vannini, C., Grassi, F., Bracale, M., Balsemin, M., Basso, B., Sala, F., Genomic stability in Arabidopsis thaliana transgenic plants obtained by floral dip. *Theor. Appl. Genet.*, **109**, 1512-1518 (2004).
- Lally, D., Ingmire, P., Tong, H.Y., He, Z.H., Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. *Plant cell*, **13**, 1317-1331 (2001).
- Langan, K. J. & Nothnagel, E. A. Cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to cell proliferation and viability. *Protoplasma* **196**, 87-98 (1997).
- Lapous, D., Mathieu, Y., Guern, J., Lauriere, C., Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification. *Planta*, **205**, 452-458 (1998).
- Laval, V., Chabannes, M., Carrière, M., Canut, H., Barre, A., Rougé, P., Pont-Lezica R., Galaud, J.P., A family of Arabidopsis plasma membrane receptors presenting animal β -integrin domains. *Biochimica et biophysica acta*, **1435**, 61-70 (1999).
- Lease, K., Ingham E., Walker, J.C., Challenges in understanding RLK function. *Current opinion in plant biology*, **1**, 388-392 (1998).
- Leckie, F., Mattei, B., Capodicase, C., Hemmings, A., Nuss, L., Aracri, B., De Lorenzo, G., Cervone, F., The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed β -strand / β -turn region of the leucine-rich repeat (LRRs) confers a new recognition capability. *The EMBO journal*, **18**, 2352-2363 (1999).
- Legendre, L., Rueter, S., Heinsteins, P.F., Low, P.S., Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (Glycine max) cells. *Plant physiology*, **102**, 233-240 (1993a).

- Levy, I., Shani, Z., Shoseyov, O., Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- β -glucanase and cellulose binding domains. *Biomolecular engineering*, **19**, 17-30 (2002).
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Dake, J.T., Tax, F.E., Walker, J.C., BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, **110**, 213-222 (2002).
- Li, J., Lease, K.A., Tax, F.E., Walker, J.C. BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5916-5921 (2001).
- Lindsey, K., Casson, S., Chilley, P., Peptides : new signalling molecules in plants. *Trends in plant science*, **7**, 78-83 (2002).
- Liners, F., Thibault, J.F., Van Cutsem, P., Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. *Plant physiology*, **99**, 1099-1104 (1992).
- Liners, F., Letesson, J.J., Didembourg, C., Van Cutsem, P., Monoclonal antibodies against pectin : recognition of a conformation induced by calcium. *Plant physiology*, **91**, 1419-1424 (1989).
- Lord, E.M., Mollet, J.C., Plant cell adhesion : a bioassay facilitates discovery of the first pectin biosynthetic gene. *Proc. Natl. Ac. Sci.USA*, **99**, 15843-15845 (2002).
- Loris, R., Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et biophysica acta*, **1572**, 198-208 (2002).
- Low, P.S., Merida, J.R., The oxidative burst in plant defense : function and signal transduction. *Physiol. Plant.*, **96**, 533-542 (1996).
- Majewska-Sawka, A., Nothnagel, E., The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant physiology*, **122**, 3-9 (2000).
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L. & Dietrich, R. A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* **26**, 403-410 (2000).
- McCarty, D.R., Chory, J., Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell*, **103**, 201-209 (2000).
- McDowell, J.M., Woffenden, J., Plant disease resistance genes : recent insights and potential applications. *Trends in biotechnology*, **21**, 178-183 (2003).
- Mehli, L., Schaart, J.G., Kjellsen, T.D., Tran, D.H., Salentijn, E.M.J., Schouten, H.J., Iversen, T.H., A gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) shows developmental regulation and pathogen-induced expression in strawberry. *New phytologist*, **163**, 99-110 (2004).
- Mellersch, D.G., Heath, M.C., Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *Plant cell*, **13**, 413-424 (2001).
- Messiaen, J., Read, N.D., Van Cutsem, P., Trewavas, A.J., Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *Journal of cell science*, **104**, 365-371 (1993).
- Messiaen, J., Van Cutsem, P., Pectic signal transduction in carrot cells : membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant cell physiology*, **35**, 677-689 (1994).
- Messiaen, J., Van Cutsem, P., Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction. *Planta*, **208**, 247-256 (1999).
- Miller, D., Connections : the hard wiring of the plant cell for perception, signaling and response. *The plant cell*, (Meeting report), 2105-2116 (1997).
- Minorsky, P.V., Frontiers of plant cell biology : signals and pathways, system-based approaches 22nd symposium in plant biology. *Plant physiology*, **132**, 428-435 (2003).
- Mohnen, D., Eberhard, S., Marfa, V., Doubrava, N., Toubart, P., Gollin, D., Gruber, T.A., Nuri, W., Albersheim, P., Darvill, A., The control of root, vegetative shoot and flower morphogenesis in tobacco thin cell-layer explants (TCLs). *Development*, **108**, 191-201 (1990).
- Molnar, G., Bancos, S., Nagy, F., Szekeres, M., Characterisation of BRH1, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **215**, 127-133 (2002).
- Moloshok, T., Pearce, G., Ryan, A., Oligouronide signaling of proteinase inhibitor genes in plants : structure-activity relationships of di- and trigalacturonic acids and their derivatives. *Archives of biochemistry and biophysics*, **294**, 731-734 (1992).
- Montesano, M., Brader, G., Tapio Palva, E., Pathogen derived elicitors : searching for receptors in plants. *Molecular plant pathology*, **4**, 73-79 (2003).
- Morris, E.R., Walker J.C., Receptor-like protein kinases : the keys to response. *Current opinion in plant biology*, **6**, 1-4 (2003).
- Muzio, M., Mantovani, A., The toll receptor family. *Allergy*, **56**, 103-108 (2001).
- Nagpal, P., Quatrano, R.S., Isolation and characterization of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* with partial sequence similarity to integrins. *Gene*, **230**, 33-40 (1999).
- Nam, K.H., Li, J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*. **110**, 203-212 (2002).
- Navarro-Gochiaca, M.T., Camut, S., Timmers, A.C.J., Niebel, A., Hervé, C., Boutet, E., Bono, J.J., Imbert, A., Cullimore, J.V., Characterization of four lectin-like receptor kinases expressed in roots of *Medicago truncatula*. Wstructure, location, regulation of expression, and potential role in the symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant physiology*, **133**, 1893-1910 (2003).
- Navazio, L., Moscattello, R., Bellincampi, D., Baldan, B., Meggio, F., Brini, M., Bowler, C., Mariani, P., The role of calcium in oligogalacturonide-activated signalling in soybean cells. *Planta*, **215**, 596-605 (2002).
- Ndimba, B.K., Chivasa, S., Hamilton, J.M., Simon, W.J., Slabas, A.R., Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of *Arabidopsis* cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics*, **3**, 1047-1059 (2003).
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., Höfte, H., A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, **17**, 5563-5576 (1998).
- Nothnagel, E. A. Proteoglycans and related components in plant cells. *Int Rev Cytol* **174**, 195-291 (1997).
- Nürnberg, T., Scheel, D., Signal transmission in the plant immune response. *Trends in plant science*, **6**, 372-379 (2001).
- O'Neill, M. A. and W. S. York. *The composition and structure of plant primary cell walls*, Blackwell publishing Ltd, Oxford (2003).
- Ovidio, R.(d'), Mattei, B., Roberti, S., Bellincampi, D., Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et biophysica acta*, **1696**, 237-244 (2004).
- Oxley, D., Bacic, A., Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, **96**, 14246-14251 (1999).
- Park, A.R., Cho, S.K., Yun, U.J., Jin, M.Y., Lee, S.H., Sachetto-Martins, G., Park, O.K., Interaction of the Arabidopsis receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3. *Journal of biological chemistry*, **276**, 26688-26693 (2001).
- Pear, J.R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W.E., Delmer, D.P., Stalker, D.M., Hogher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, **93**, 12637-12642 (1996).
- Penel, C., Van Cutsem, P., Greppin, H., Interactions of a plant peroxidase with oligogalacturonides in the presence of calcium ions. *Phytochemistry*, **51**, 193-198 (1999).
- Perez, S., Rodriguez-Carvajal, M.A., Doco, T., A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan. II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, **85**, 109-121 (2003).
- Pilling, E., Höfte, H., Feedback from the wall. *Current opinion in plant biology*, **6**, 611-616 (2003).

- Ransbotyn, V., Contribution à l'étude de l'interaction de la protéine WAK1 avec la paroi cellulaire végétale. Mémoire de fin d'études, FUNDP, Namur, (2004).
- Raven, P. H., R. F. Evert, et al. Biologie végétale. Bruxelles, De Boeck Université S.A. (2000).
- Reymond, P., Kunz, B., Paul-Plutzer, K., Grimm, R., Eckerskorn, C., Farmer, E.E., Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant cell*, **8**, 2265-2276 (1996).
- Reymond, P., Grünberger, S., Paul, K., Müller, M., Farmer, E.E., Oligogalacturonide defense signals in plants : large fragments interact with the plasma membrane in vitro. *Proc. Natl. Ac.Sci. USA*, **92**, 4145-4149 (1995).
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D., Pectins : structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, **57**, 929-967 (2001).
- Robertson, B., Elicitors of the production of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls. *Physiol. Mol. Plant pathol.*, **28**, 137-148 (1986).
- Rombouts, F.M. & Thibault, J.-F., Feruloylated pectic substances from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, **154**, 177-187 (1986).
- Rout-Mayer, M.A., Mathieu, Y., Cazalé, A.C., Guern, J., Laurière, C., Extracellular alkalization and oxidative burst induced by fungal pectin lyase in tobacco cells are not due to the perception of oligogalacturonide fragments. *Plant Physiol. Biochem.*, **35**, 321-330 (1997).
- Sachetto-Martins, G., Franco, L.O., De Oliveira, D.E., Plant glycine-rich proteins : a family or just proteins with a common motif . *Biochimica et biophysica acta*, **1492**, 1-14 (2000).
- Schaller, G.E., Histidine kinases and the role of two-component systems in plant. *Botanical research*, **32**, 109-148 (edited by Kreis M., Walker, J.C.) (2000).
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. et Manners, J.M., Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11655-11660 (2000).
- Sedbrook, J.C., Carroll, K.L., Hung, K.F., Masson, P.H., Somerville, C.R., The *Arabidopsis* SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *Plant cell*, **14**, 1635-1648 (2002).
- Shi, H., Kim, Y., Guo, Y., Stevenson, B., Zhu, J.K., The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant cell*, **15**, 19-32 (2003).
- Shiu, S.H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y.H., Mayer, K.F.X., Li, W.H., Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant cell*, **16**, 1220-1234 (2004).
- Shiu, S.H., Bleecker, A.B., Expansion of the receptor-like kinase / pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, **132**, 530-543 (2003).
- Shiu, S.H., Bleecker, A.B., Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, **98**, 10763-10768 (2001).
- Showalter, A.M., Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant cell*, **5**, 9-23 (1993).
- Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z.H., Tong, H., Osawa, H., Baluska, F., Volkmann, D., Matsumoto, H., Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, **132**, 2256-2266 (2003).
- Song, W.Y., Pi, L.Y., Wang, G.L., Gardner, J., Holsten, T., Ronald, P.C., Evolution of the rice Xa21 disease resistance gene family. *Plant cell*, **9**, 1279-1287 (1997).
- Spiro, M.D., Ridley, B.L., Eberhard, S., Kates, K.A., Mathieu, Y., O'Neill, M.A., Mohnen, D., Guern, J., Darvill, A., Albersheim, P., Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant physiology*, **116**, 1289-1298 (1998).
- Stahl, E.A., Bishop, J.G., Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Current opinion in plant biology*, **3**, 299-304 (2000).
- Stennis, M.J., Chandra, S., Ryan, C.A., Low, P.S., Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. *Plant physiology*, **117**, 1031-1036 (1998).
- Svetek, J., Yadav, M.P., Nothnagel, E.A., Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose Arabinogalactan proteins. *Journal of biological chemistry*, **274**, 14724-14733 (1999).
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K., The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature*, **403**, 913-916 (2000).
- Tepper, C.S., Anderson, A.J., Interactions between pectic fragments and extracellular components from the fungal pathogen *Collectotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, **36**, 147-158 (1990).
- Tichtinsky, G., Vanoosthuyse, V., Cock, J.M., Gaude, T., Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends in plant science*, **8**, 231-237 (2003).
- Torii, K.U., Receptor kinase activation and signal transduction in plants : an emerging picture. *Current opinion in plant biology*, **3**, 361-367 (2000).
- Underhill, D.M., Toll-like receptors : networking for success. *European journal of immunology*, **33**, 1767-1775 (2003).
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in plant science*, **5**, 67-74 (2000).
- Van Cutsem, P., Messiaen, J., Biological effects of pectic fragments in plant cells. *Acta Bot. Neerl.*, **43**, 231-245 (1994).
- Verica, J.A., He, Z.H., The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant physiology*, **129**, 455-459 (2002).
- Verica, J.A., Chae, L., Tong, H., Ingmire, P., He, Z.H., Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cell wall-associated kinase-like genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, **133**, 1732-1746 (2003).
- Vincken, J.P., Schols, H.A., Oomen, R.J.F.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., Visser, G.F., If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant physiology*, **132**, 1781-1789 (2003).
- Visser, J., Voragen, A.G.J. (Eds.), Pectins and pectinases, progress in biotechnology, vol. 14, Amsterdam, Elsevier, (1996).
- Vorwerk, S., Somerville, S., Somerville, C., The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in plant science*, **9**, 203-209 (2004).
- Wagner, T.A., Kohorn, B.D., Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant cell*, **13**, 303-318 (2001).
- Walker-Simmons, M., Jin, D., West, C.A., Hakwiger, L., Ryan, C.A., Comparison of proteinase inhibitor-inducing activities and phytoalexin elicitor activities of a pure fungal endopolygalacturonase, pectic fragments, and chitosan. *Plant physiology*, **76**, 833-836 (1984).
- Wang, G.L., Ruan, D.L., Song, W.Y., Sideris, S., Chen, L., Pi, L.Y., Zhang, S., Zhang, Z., Fauquet, C., Gaut, B.S., Whalen, M.C., Ronald, P.C., Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant cell*, **10**, 765-779 (1998).
- Wasserman, S.A., Toll signaling : the enigma variations. *Current opinion in genetics and development*, **10**, 497-502 (2000).
- Wiedemeier, A. M., Judy-March, J. E., Hocart, C. H., Wasteneys, G. O., Williamson, R. E. & Baskin, T. I. Mutant alleles of *Arabidopsis* RADIALLY SWOLLEN 4 and 7 reduce growth anisotropy without altering the transverse orientation of cortical microtubules or

- cellulose microfibrils. *Development* **129**, 4821-30 (2002).
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P., Pectin : cell biology and prospects for functional analysis. *Plant molecular biology*, **47**, 9(27 (2001).
- Wyatt, S.E., Carpita, N.C., The plant cytoskeleton-cell wall continuum. *Trends in cell biology*, **3**, 413-417 (1993).
- Yang, E.J., Oh, Y.A., Lee, E.S., Park, A.R., Cho, S.K., Yoo, Y.J., Park, O.K., Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in Arabidopsis. *Biochemical and biophysical research communications*, **305**, 862-868 (2003).
- Yin, Y., Wang, Z.Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J., BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, **109**, 181-191 (2002).
- York, W.S., Qin, Q., Rose, J.K.C., Proteinaceous inhibitors of endo- β -glucanases. *Biochimica et biophysica acta*, **1696**, 223-233 (2004).
- Yu, Q., Hlavacka, A., Matoh, T., Volkmann, D., Menzel, D., Goldbach, H.E., Baluska, F., Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of cell wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices. *Plant physiology*, **130**, 415-421 (2002).
- Zhu, J.K., Damsz, B., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 α . *Plant cell*, **6**, 393-404 (1994).
- Zhu, J.K., Shi, J., Singh, U., Wyatt, S.E., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Carpita, N.C., Enrichment of vitronectin-and fibronectin-like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. *Plant journal*, **3**, 637-646 (1993).